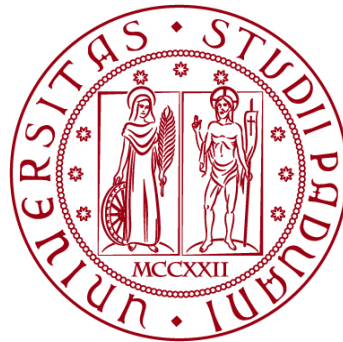


**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA**

**Corso di Laurea in Biologia Molecolare**



**ELABORATO DI LAUREA**

**Ruolo dell'oncometabolita acido metilmalonico nella  
formazione delle metastasi**

**Tutor:** Prof. Luigi Leanza

Dipartimento di Biologia

**Laureanda:** Aurora Pegoraro

**ANNO ACCADEMICO 2022/2023**



## INDICE

1. ABSTRACT.....	1
2. INTRODUZIONE .....	3
3. METODOLOGIE UTILIZZATE .....	7
3.1 RNA-Seq.....	7
3.2 <i>Knockdown</i> genico.....	7
3.3 Esperimenti di co-coltura .....	8
3.4 Immunoblot.....	8
3.5 Iniezione sottocutanea in topi.....	9
3.6 Saggi di invasione e di migrazione <i>transwell</i> .....	9
3.7 Saggi di resistenza ai farmaci.....	10
3.8 Analisi proteomica delle vescicole extracellulari .....	10
4. RISULTATI.....	11
4.1 L'MMA secreto dalle cellule tumorali attiva i fibroblasti nel microambiente tumorale .....	11
4.2 I fibroblasti trattati con MMA secernono vescicole extracellulari che contengono sostanze per promuovere un fenotipo tumorale pro-aggressivo	12
4.3 I CAF attivati dall'MMA, mediante la secrezione di IL-6 in vescicole, mediano la segnalazione metastatica nelle cellule tumorali .....	14
4.4 MMA attiva i fibroblasti attraverso la segnalazione NF- $\kappa$ B e TGF $\beta$ mediata da specie reattive dell'ossigeno .....	16
5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI .....	21
6. BIBLIOGRAFIA.....	23

## APPENDICE



## 1. ABSTRACT

I cambiamenti che avvengono a livello metabolico con l'età, in caso di patologie o di una scorretta alimentazione possono in alcuni casi alterare alcune vie metaboliche e favorire la formazione di un microambiente tumorale (TME) che sostiene la progressione del cancro. In questo articolo ci concentriamo sul ruolo dell'acido metilmalonico (MMA) ovvero un oncometabolita prodotto dalla via metabolica del propionato che può, se in eccesso, essere coinvolto e favorire lo sviluppo aggressivo di alcuni tipi di cancro. L'MMA, generalmente, si accumula nel siero degli anziani e può essere prodotto dalle cellule tumorali stesse guidandone la progressione in modo autocrino e paracrino. L'MMA secreto dalle cellule tumorali va ad agire sul microambiente tumorale (TME) attivando nello stroma i fibroblasti associati al cancro (CAF) attraverso vie di segnalazione come TGF $\beta$  e NF- $\kappa$ B attivate a loro volta da specie reattive dell'ossigeno (ROS). Questi CAF secernono vescicole extracellulari contenenti varie molecole, tra cui IL-6, che va ad attivare determinate vie di segnalazione nelle cellule tumorali per promuovere un fenotipo pro-aggressivo resistente ai farmaci, che favorisce la transizione da epitelio a mesenchima (EMT) per promuovere l'invasione dei tessuti e con una maggiore formazione di metastasi.



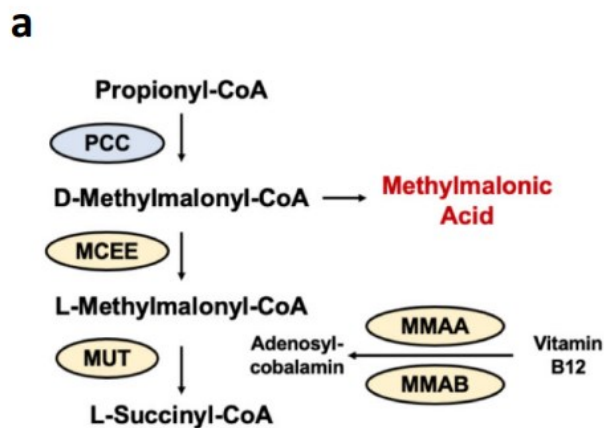
## 2. INTRODUZIONE

L'alimentazione ed un adeguato stile di vita sono la chiave per preservare la salute e sono alla base di un invecchiamento di buona qualità perché consentono di mantenere un corretto funzionamento metabolico. I cambiamenti che avvengono a livello metabolico, infatti, possono in alcuni casi favorire la formazione di un microambiente tumorale (TME) che favorisce a sua volta la progressione del cancro.

Quello di cui si sono occupati gli autori dell'articolo oggetto di questa tesi è la trattazione del ruolo dell'accumulo di acido metilmalonico (MMA), un acido dicarbossilico che viene prodotto dalla via metabolica del propionato, nella progressione tumorale.

L'acido propionico è un metabolita che si ottiene da varie vie metaboliche come, ad esempio, dalla degradazione degli acidi grassi a catena dispari, dalla catena laterale del colesterolo, dalla degradazione di alcuni amminoacidi come treonina, valina, isoleucina e metionina e può essere anche prodotto dal microbioma intestinale in caso di disbiosi. L'acido propionico deriva quindi da diverse fonti alimentari e il suo metabolismo richiede la presenza di vari cofattori, tra cui la vitamina B12. Capiamo quindi quanto una corretta alimentazione, sia per quanto riguarda i macronutrienti che i micronutrienti, sia importante per preservare il corretto funzionamento metabolico dell'organismo.

La **figura 1** mostra i processi a cui va incontro l'acido propionico una volta prodotto: da questo acido si ottiene una molecola a 3 atomi di carbonio detta Propionil-CoA la quale viene carbossilata e si trasforma in D-metilmalonil-CoA grazie all'enzima Propionil-CoA carbossilasi (PCC). Successivamente, ad opera della metilmalonil-CoA epimerasi (MCEE), il D-metilmalonil-CoA viene trasformato in L-metilmalonil-CoA che a sua volta, grazie all'enzima metilmalonil-CoA mutasi (MUT) e in presenza di vitamina B12, verrà trasformato in L-succinil-CoA ovvero un intermedio del ciclo di Krebs.



**Figura 1:** via metabolica del propionato.

La vitamina B12 ha un ruolo importante perché permette la formazione corretta del coenzima adenosil-cobalamina, responsabile a sua volta del corretto funzionamento dell'enzima MUT.

Un ulteriore passaggio rilevante in questa via è la formazione del D-metilmalonil-CoA in quanto questa molecola può seguire un altro destino diventando acido metilmalonico e, se per qualche motivo la via del propionato risulta disregolata, si può avere un accumulo di MMA. Le ragioni che possono portare ad un funzionamento non fisiologico della via del propionato sono varie. Possono esserci ragioni genetiche che fanno riferimento a mutazioni a livello degli enzimi della via metabolica che portano ad una condizione patologica detta acidemia metilmalonica ovvero una malattia letale e grave che può essere classificata in due forme principali in base ai fenotipi riscontrati: aciduria metilmalonica isolata dovuta a difetti della metilmalonil-CoA mutasi o alla sintesi del coenzima MUT adenosil-cobalamina e aciduria metilmalonica combinata e omocistinuria combinate caratterizzate da un'elevata omocisteina plasmatica e da livelli ridotti di coenzimi (<sup>1</sup>). Altre cause, non genetiche, che possono portare ad un accumulo di MMA sono ad esempio una scorretta alimentazione e in modo specifico ci si riferisce ad assunzioni eccessive di quei nutrienti che degradati generano l'acido propionico o per la mancanza di vitamina B12 dovuta a malassorbimento o a carenze nutrizionali che si riscontrano soprattutto negli anziani.

Il metabolismo è quindi condizionato in modo molto complesso sia da quello che mangiamo che da fattori endogeni che in alcuni contesti, come l'invecchiamento, possono favorire un ambiente favorevole allo sviluppo di tumori. In uno studio (<sup>2</sup>) si è ipotizzato che in seguito ai cambiamenti metabolici che avvengono con l'invecchiamento si produca un ambiente sistemico che supporta la progressione tumorale. Per dimostrarlo si sono esaminate le composizioni metaboliche del siero di alcuni donatori anziani: di 179 metaboliti circolanti rilevati in modo mirato, 10 sono risultati alterati in modo significativo e, escludendo quelli con funzioni note a livello di invecchiamento, si sono ottenuti tre metaboliti aumentati in modo significativo ovvero MMA, fosfoenolpiruvato e chinolinato. Di questi tre solo l'MMA ha indotto in cellule di carcinoma polmonare un fenotipo pro-aggressivo. Inoltre, nello stesso studio, sono state trattate cellule di carcinoma polmonare con sieri provenienti da donatori sani con età inferiore ai 30 anni o da sieri di donatori sani con età superiore ai 60 anni: solo le cellule trattate con il siero di anziani ha portato alla trasformazione delle cellule in mesenchimali, confermando che l'aumento di MMA nel siero degli anziani ha un ruolo nello sviluppo tumorale.

Nell'ambito della via del propionato le cellule tumorali stesse disregolano questa via metabolica al fine di aumentare l'accumulo locale di MMA, che funge da oncometabolita guidando la progressione del cancro in modo autocrino, paracrino ed endocrino ed è proprio questo aspetto che andremo ad approfondire.

Nello sviluppo dei tumori ha un ruolo cruciale il microambiente tumorale ovvero il "cross talk" che si genera tra cellule tumorali, stroma, fibroblasti e cellule del tessuto. Il microambiente influenza la progressione metastatica in quanto nella sua rete eterogenea abbiamo una serie di fattori e mediatori chimici secreti come ad



esempio enzimi, ormoni, citochine, metaboliti, che aiutano a generare un processo tumorigenico e metastatico. Questo processo è aiutato dalla presenza di fibroblasti associati al cancro (CAF) che, in questo articolo, si dimostrano essere attivati a partire dai fibroblasti stromali in seguito alla presenza di MMA prodotto dalle cellule tumorali stesse. I CAF hanno un ruolo fondamentale nello sviluppo progressivo del cancro in quanto sono responsabili: I) della secrezione di molecole solubili come fattori di crescita per la proliferazione cellulare e citochine per regolare il sistema immunitario; II) della modificazione del microambiente tumorale rimodellando la matrice extracellulare e grazie alla transizione da epitelio a mesenchima (EMT); III) della stimolazione dell'angiogenesi e della resistenza ai farmaci.

Le sostanze rilasciate dai CAF attivati fungono da messaggeri tra stroma e cellule del tessuto e sono veicolate, per un trasporto più veloce, da vescicole lipidiche extracellulari che possono contenere concentrazioni diverse di queste molecole che possono quindi a loro volta determinare un effetto diverso sulle cellule su cui agiscono.

L'MMA prodotto dalle cellule tumorali causa nei fibroblasti, attraverso meccanismi non ancora completamente noti, una produzione aumentata di specie reattive dell'ossigeno (ROS) che riescono ad attivare le vie di segnalazione TGF $\beta$  e NF- $\kappa$ B che inducono a loro volta i fibroblasti a rilasciare vescicole contenenti messaggeri chimici coinvolti nella tumorigenesi. I CAF in cui vengono attivate queste vie producono e secernono messaggeri che vanno ad agire sulle cellule tumorali e in particolare producono molecole coinvolte nella determinazione di un fenotipo tumorale invasivo e che origina metastasi attraverso l'induzione di EMT. L'EMT avviene grazie alla de-differenziazione delle cellule epiteliali in cellule mesenchimali mobili: nelle cellule epiteliali vengono disassemblate le giunzioni tra le cellule che quindi perdono la loro polarità apicale-basale, viene riorganizzato il citoscheletro con l'acquisizione di mobilità, vengono *down*-regolati geni epiteliali e attivati quelli mesenchimali e viene acquisita la capacità di degradare le proteine della matrice extracellulare. Il processo è mediato da fattori di trascrizione finemente regolati e consente, attraverso il rimodellamento della matrice extracellulare, di supportare l'invasione delle cellule tumorali attraverso il tessuto, favorendo quindi l'acquisizione di un fenotipo aggressivo <sup>(3)</sup>.

Inoltre, nell'articolo viene mostrato che l'IL-6 è una delle principali molecole maggiormente sovra-regolate nelle vescicole secrete dai fibroblasti attivati dall'MMA ed è in grado di mediare la via di segnalazione JAK/STAT nelle cellule tumorali. Le proteine JAK sono dette *Janus chinasi* e vanno ad attivare le proteine STAT, trasduttrici del segnale ed attivatori della trascrizione, che a loro volta provocano una risposta a livello intracellulare modificando nel nucleo l'espressione genica. La via svolge un ruolo centrale nella regolazione di processi di proliferazione, differenziamento e apoptosi, riguardanti il destino delle cellule.

Infine, un ruolo importante nel determinare l'aggressività, e di conseguenza la mortalità dei tumori, è legato allo sviluppo di metastasi: la stragrande maggioranza dei decessi associati al cancro, circa il 90%, è causata più dallo sviluppo di metastasi piuttosto che dai tumori primari. La sequenza di eventi che portano allo sviluppo di metastasi sono: 1) invasione delle cellule tumorali primarie nei tessuti circostanti; 2) intravasazione sia come singole cellule tumorali circolanti che come cluster multicellulari di queste cellule nel sistema circolatorio attraverso l'aumento della permeabilità dei vasi; 3) arresto e stravasazione attraverso le pareti vascolari e arrivo al parenchima di altri tessuti, anche distanti, dove si insediano e formano colonie micrometastatiche, che iniziano a proliferare diventando lesioni clinicamente rilevabili. Una volta arrivate nel nuovo tessuto le cellule tumorali devono possedere la capacità di iniziare un nuovo tumore e devono essere in grado di adattarsi al nuovo ambiente che trovano <sup>(4)</sup>.

I carcinomi, che rappresentano una grande percentuale dei casi di cancro, sono molto studiati e sono un ottimo modello per studiare questo tipo di processo. Nell'articolo trattato sono utilizzate principalmente cellule di carcinoma polmonare e dermico che iniziano il loro programma di metastatizzazione grazie alla EMT che permette di guidare la disseminazione delle cellule di carcinoma in siti anatomici più distanti.

Lo sviluppo di metastasi spesso si verifica quando il tumore è in stadi avanzati ma in alcuni casi può avvenire precocemente durante il processo di trasformazione neoplastica: capire come funziona questa via di segnale può aiutare a migliorare la qualità della vita delle persone affette da questa patologia. Inoltre, la comprensione di come il metabolismo influenza la capacità delle cellule tumorali di evolvere verso un fenotipo aggressivo può aprire le porte a nuove strategie terapeutiche e bloccare o perlomeno diminuire la resistenza ai farmaci e lo sviluppo di metastasi, riducendo così i problemi associati al cancro e la mortalità di questa patologia.

### 3. METODOLOGIE UTILIZZATE

In questa sezione vengono analizzate le principali tecniche di biologia molecolare, biologia cellulare e biochimica utilizzate negli esperimenti che verranno riportati nella trattazione dei risultati ottenuti durante lo sviluppo del problema biologico.

**3.1 RNA-Seq:** tecnica di sequenziamento di nuova generazione utilizzata per rivelare la presenza e la quantità di RNA in un campione biologico in un determinato momento analizzando il trascrittoma cellulare. Questa tecnica permette di esaminare trascrizioni alternative di splicing genico, modifiche post-trascrizionali, fusione genica, di determinare i confini tra esoni ed introni, mutazioni, cambiamenti dell'espressione genica nel tempo o differenze nell'espressione genica in gruppi o trattamenti diversi. Per ogni campione si isola l'mRNA e lo si sequenzia direttamente sottoforma di RNA con Nanopore o tramite conversione in cDNA con Illumina. Quello che si ottiene è la generazione di tante sequenze rappresentative del trascrittoma che vanno poi allineate con il genoma di riferimento: l'idea di base è che tante più sequenze cadono in una regione del genoma, tanto più quella regione è espressa. Ovviamente per fare questo ragionamento bisogna considerare il numero di "reads" generate nell'esperimento e la lunghezza dei trascritti. Progressi recenti hanno reso possibile il sequenziamento del trascrittoma di singole cellule.

Negli esperimenti analizzati l'RNA è stato estratto utilizzando un kit, la sua integrità è stata verificata con un analizzatore e le concentrazioni di RNA sono state misurate utilizzando il sistema Nanodrop. L'RNA è stato poi convertito in librerie di cDNA successivamente sequenziate utilizzando Illumina. Le letture sono poi state mappate sul genoma di riferimento umano GRCh38 da STAR (Versione 2.5.2) e in seguito sono stati costruiti i profili di espressione utilizzando dei test parametrici.

**3.2 Knockdown genico:** tecnica attraverso la quale l'espressione di uno o più geni di un organismo viene ridotta. Tale riduzione può essere transiente o stabile e può avvenire attraverso tecniche di ingegneria genetica che vanno a colpire il gene in questione, quindi il bersaglio è il DNA, o attraverso trattamenti con molecole come corti oligonucleotidi di RNA. Nell'ambito dell'RNA un ruolo importante lo hanno gli shRNA, detti *small hairpin* o *short hairpin* RNA, ovvero sequenze di RNA parzialmente complementari che si ripiegano a formare una forcina. Gli shRNA una volta nella cellula vengono trascritti e processati in modo da produrre dsRNA in grado di attivare il meccanismo di RNA *interfering* (RNAi), ovvero di silenziamento genico. Questa tecnica può prevedere anche l'utilizzo di plasmidi lentivirali che contengono la sequenza complementare al gene che si vuole silenziare e spesso vengono inseriti nella cellula attraverso trasfezioni lipidiche. Una volta che questo RNA viene trascritto, ed è presente nella cellula in cui si vuole silenziare un gene, si avviano i processi di RNAi che portano il gene a non essere espresso o ad esserlo in maniera ridotta.

La tecnica è stata utilizzata per silenziare alcuni enzimi della via metabolica del propionato, come ad esempio MUT, per simulare l'accumulo locale di MMA in cellule tumorali in modo da poterne vedere gli effetti.

**3.3 Esperimenti di co-coltura:** tecnica in cui sono presenti due tipi cellulari diversi che crescono insieme *in vitro*. Nel nostro caso è stata utilizzata per far crescere e vedere le interazioni reciproche delle cellule tumorali, sia di controllo che con *knockdown* di MUT, con i fibroblasti seminati su piastre a sei pozzetti.

**3.4 Immunoblot:** detto anche Western blot è una tecnica biochimica che permette di identificare una determinata proteina tra tante mediante l'utilizzo di anticorpi specifici per quella proteina. Generalmente, per facilitare la rilevazione della proteina, la tecnica può essere preceduta da altre che separano le proteine in base ad alcune caratteristiche come, ad esempio, in base alla loro dimensione tramite SDS-PAGE. Successivamente le proteine vengono trasferite su una membrana di nitrocellulosa che viene poi saturata, di solito con latte in polvere o albumina sierica, per bloccare i siti aspecifici a cui si potrebbero legare gli anticorpi. Per ultima cosa si incuba con l'anticorpo specifico che, in base alla metodica, potrà essere usato da solo o con un anticorpo secondario. Il segnale può poi essere rilevato in modi diversi in base agli anticorpi utilizzati e alla metodica.

Negli esperimenti analizzati le proteine sono state isolate direttamente dalle cellule di interesse mediante estrazione acida: una volta precipitate sono state raccolte e fatte solubilizzare. Per quanto riguarda le proteine estratte dalle vescicole sono stati utilizzati degli specifici tamponi. Le proteine sono poi state quantificate mediante un kit e 30 µg di proteine totali, per ciascun campione, sono stati caricati e fatti correre su SDS-PAGE che ha permesso la separazione delle proteine in base al loro peso molecolare. Le proteine così separate sono state successivamente trasferite su una membrana di nitrocellulosa bloccata in un tampone Odyssey Blocking basato su TBS. Le membrane sono state incubate con anticorpi primari durante la notte a 4°C e successivamente con:

- un anticorpo anti-coniglio coniugato con perossidasi di equino, anti-topo o anti-capra per 1 ora a temperatura ambiente e i segnali sono stati sviluppati con un sistema di rilevamento Amersham ECL;
- oppure con anticorpi asino anti-coniglio o asino anti-topo per 1 ora a temperatura ambiente e visualizzati con LI-COR Odyssey CLx Imaging System.

Questa tecnica è stata utilizzata più volte nella trattazione del problema biologico per:

- rilevare i marcatori associati ai CAF nei fibroblasti MRC5<sup>1</sup> e BJ<sup>2</sup> in coltura con cellule tumorali A549<sup>3</sup> e A375<sup>4</sup> di controllo e con MUT silenziato;
- individuare la differente espressione di marcatori EMT quando cellule A549 crescono con il mezzo di crescita di fibroblasti MRC5 trattati con un controllo o con MMA;

---

<sup>1</sup> Fibroblasti (CCL-171) isolati dal tessuto polmonare derivato da un embrione umano maschio di 14 settimane, ottenuti dall'American Type Culture Collection (ATCC).

<sup>2</sup> Fibroblasti (CRL-2522) prelevati dalla pelle del prepuzio di un maschio neonato, ottenuti dall'American Type Culture Collection (ATCC).

<sup>3</sup> Cellule (CCL-185) epiteliali umane di carcinoma polmonare isolate da un maschio di 58 anni affetto da carcinoma, ottenute dall'American Type Culture Collection (ATCC).

<sup>4</sup> Cellule (CRL-1619) di melanoma isolate dalla pelle di una paziente di 54 anni, ottenute dall'American Type Culture Collection (ATCC).

- mostrare come variano i marcatori EMT nelle cellule A549 dopo aver inibito le vie di segnalazione indotte nelle cellule tumorali dalle molecole secrete dai fibroblasti attivati da MMA;
- mostrare come variano i marcatori CAF in fibroblasti MRC5 trattati con un controllo, con MMA e con MMA insieme a degli antiossidanti;
- mostrare la quantità di IL-6 contenuta nelle vescicole secrete da fibroblasti MRC5 trattati con un controllo, con MMA e con MMA combinato a degli antiossidanti;
- mostrare i marcatori EMT in cellule A549 trattate con vescicole provenienti da fibroblasti di controllo, con vescicole prodotte da fibroblasti trattati con MMA e con vescicole prodotte da fibroblasti trattati con MMA e con specifici inibitori delle vie di segnale che l'MMA è in grado di attivare nei fibroblasti.

**3.5 Iniezione sottocutanea in topi:** i topi utilizzati nello studio sono topi femmina atimici omozigoti nu/nu. Questi topi presentano delle caratteristiche particolari come l'assenza del pelo, motivo per cui sono stati chiamati nudi "nu", una crescita ritardata e una ridotta fertilità. I topi atimici sono un ceppo murino portatore di una delezione spontanea nel gene Foxn1, codificante dei fattori di trascrizione, che causa un compromesso o assente timo. Questa condizione porta i topi ad avere un sistema immunitario compromesso che si evidenzia in modo particolare con un numero ridotto di linfociti T: questo permette la crescita e la metastatizzazione di cellule tumorali. Sono utilizzati molto come ospiti per cellule tumorali e rappresentano un valido modello per gli studi sul comportamento del cancro *in vivo* e lo studio di farmaci antitumorali <sup>(5)</sup>.

Negli esperimenti analizzati, i topi sono stati anestetizzati con isofluorano e iniettati con cellule A549 o con una miscela di cellule A549 e fibroblasti MRC5 per via sottocutanea sul fianco sinistro. Questo procedimento permette di vedere gli effetti del tumore *in vivo* a livello di crescita della massa del tumore primario e della capacità di metastatizzare. La crescita tumorale primaria è stata monitorata settimanalmente mediante imaging *in vivo* ed è stata poi misurata la luminescenza. Per visualizzare la diffusione metastatica invece i topi sono stati sacrificati alla fine di 5 settimane: gli organi ottenuti, tra cui fegato, polmoni, cervello, milza e reni, sono stati collocati in piastre a 12 pozzetti dove sono stati ripresi utilizzando il sistema di imaging *in vivo* preclinico ed è stata anche qui poi monitorata la luminescenza.

**3.6 Saggi di invasione e di migrazione *transwell*:** test che quantifica la migrazione e l'invasione cellulare in cellule esposte a sostanze di cui si vuole studiarne l'effetto. Vengono utilizzate delle piastre *multiwell* separate in due compartimenti: nel compartimento superiore vengono messe le cellule che si vogliono studiare mentre nel compartimento inferiore vengono messe sostanze attrattive. La migrazione viene quantificata in base al numero di cellule che dal compartimento superiore passano a quello inferiore in un certo tempo.

Negli esperimenti proposti le cellule tumorali A549 sono state trattate per 5 giorni con vescicole provenienti da fibroblasti, sia di controllo che trattati con MMA. Nelle

piastre *multiwell* nel compartimento inferiore è stato messo del terreno con FBS, utilizzato come chemio attrattore, mentre nel compartimento superiore sono state aggiunte le cellule risospese. Sono state utilizzate camere diverse per i saggi di migrazione e di invasione, ma in entrambi i saggi le cellule sono state lasciate migrare e invadere per 24 ore. Dopo la migrazione e l'invasione le cellule migrate nel compartimento inferiore sono state fissate in etanolo e colorate con lo 0,1% di cristal violetto per essere poi visualizzate al 10x con una fotocamera e quantificate.

**3.7 Saggi di resistenza ai farmaci:** tecnica che permette di valutare la sensibilità, e quindi l'efficacia, di determinati farmaci sulle colture cellulari.

Questo test è stato effettuato per vedere la differente risposta ai farmaci carboplatino e paclitaxel, a concentrazioni diverse, in cellule tumorali A549 precedentemente trattate per 5 giorni con vescicole provenienti da fibroblasti di controllo o trattati con MMA.

Le cellule sono state incubate per 3 giorni con i farmaci, fissate, colorate con il cristal violetto e lasciate asciugare a temperatura ambiente. È stata poi misurata l'assorbanza a 590 nm con un lettore di piastre Envision per andare a quantificare la biomassa cellulare relativa.

**3.8 Analisi proteomica delle vescicole extracellulari:** la proteomica si occupa di identificare proteine, di caratterizzarle strutturalmente e funzionalmente, di quantificarle e di studiarne eventuali interazioni molecolari. La proteomica è dinamica nel tempo in quanto si occupa sostanzialmente di analizzare l'intero corredo proteico contenuto, nel nostro caso all'interno delle vescicole, in un dato momento tenendo conto anche di isoforme, modifiche post-traduzionali, ecc..

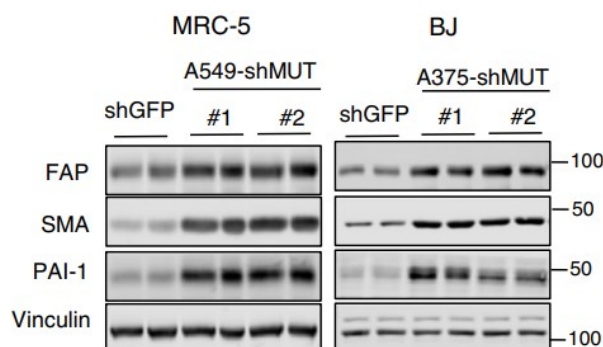
Nell'esperimento considerato le vescicole, provenienti da fibroblasti trattati con un controllo o con MMA, sono state isolate dal mezzo di crescita dei fibroblasti stessi. È stata poi eseguita un'analisi di spettrometria di massa, in grado di dividere le molecole in base al rapporto massa/carica, introducendo i peptidi mediante ionizzazione elettrospray mentre eluivano da una colonna imballata. I dati ottenuti dallo spettro di massa sono stati abbinati alle sequenze peptidiche utilizzando COMET e Uniprot.

## 4. RISULTATI

### 4.1 L'MMA secreto dalle cellule tumorali attiva i fibroblasti nel microambiente tumorale

Per dimostrare che le cellule tumorali disregolano la via del propionato con un conseguente accumulo locale di MMA per favorire la loro aggressività, sono state profilate, tramite RNA-Seq, le trascrizioni degli enzimi a valle della via del propionato, come MUT e MCEE, in singole cellule ottenute da tumori primari e metastasi di carcinoma polmonare umano. Quello che si è ottenuto è che le cellule tumorali con ridotta espressione di questi geni erano arricchite in sottopopolazioni mesenchimali: è avvenuta quindi una maggiore transizione da epitelio a mesenchima (EMT), fattore chiave nell'evoluzione dell'invasività e nello sviluppo delle metastasi.

Il passo successivo è stato verificare da cosa dipendesse la predisposizione delle cellule tumorali ad andare incontro ad EMT in questa condizione, cercando di capire come l'MMA agisce sul microambiente tumorale e che effetto causa la sua presenza sulle altre cellule. In particolare, si è interessati a capire che effetti causa l'MMA sui fibroblasti, essendo questi molto ben rappresentati nello stroma. Per fare questo è stato silenziato MUT in cellule di carcinoma polmonare A549 e in cellule di melanoma A375 per simulare l'accumulo di MMA. Queste sono poi state co-coltivate con fibroblasti polmonari MRC5 e dermici BJ ottenendo un aumento dei marcatori CAF nei fibroblasti, come riportato in **figura 2**. Questo risultato suggerisce che l'MMA prodotto dal tumore è secreto e riesce ad attivare i fibroblasti nello stroma a fibroblasti associati al cancro (CAF).



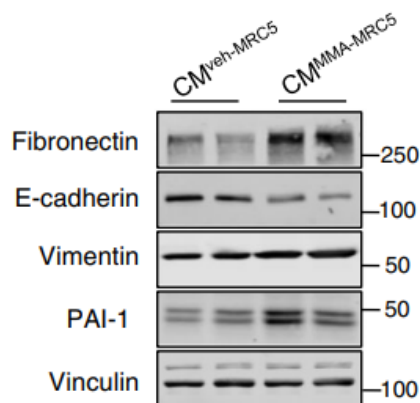
**Figura 2:** Immunoblots che misurano i marcatori CAF nei fibroblasti MRC5 e BJ co-colturati per 4 giorni con cellule tumorali A549 e A375 shGFP (controllo) e shMUT. La vinculina è utilizzata come controllo del caricamento. Si vede che i fibroblasti, sia MRC5 che BJ, messi a contatto con cellule tumorali shMUT, mostrano un aumento dei marcatori tumorali CAF come FAP, SMA e PAI-1.

Da studi precedenti, si era a conoscenza che l'MMA nel siero non è presente in forma libera ma incapsulato in vescicole lipidiche extracellulari che consentono un ingresso più veloce di questa molecola nelle cellule rispetto alla stessa in forma libera.

Sono state isolate le vescicole lipidiche dai mezzi di coltura dove sono cresciute sia le cellule tumorali A549 in cui è stato effettuato il silenziamento di MUT ( $EV^{shMUT-A549}$ ), che le cellule tumorali A549 di controllo ( $EV^{shGFP-A549}$ ), e si è visto che effettivamente le vescicole isolate dal mezzo di crescita delle cellule tumorali con MUT silenziato trasportano più MMA rispetto a quelle di controllo. Inoltre, a conferma del fatto che l'MMA secreto dal tumore è contenuto in vescicole, si è osservato che dopo l'esaurimento delle vescicole dal mezzo di crescita delle cellule tumorali con shMUT, queste non erano più in grado di indurre marcatori CAF nei fibroblasti.

#### 4.2 I fibroblasti trattati con MMA secernono vescicole extracellulari che contengono sostanze per promuovere un fenotipo tumorale pro-aggressivo

Dopo aver dimostrato che l'MMA, rilasciato dalle cellule tumorali all'interno di vescicole, attiva i fibroblasti nello stroma a CAF, è stato osservato che i fibroblasti trattati con MMA secernono sostanze e mediatori chimici in grado di far assumere alle cellule tumorali delle caratteristiche aggressive. Sono state coltivate le cellule tumorali A549<sup>5</sup> con il mezzo di crescita di fibroblasti MRC5 trattati rispettivamente con un controllo o con MMA: si è ottenuto un aumento dei marcatori EMT nelle cellule tumorali trattate con il mezzo di crescita di fibroblasti trattati con MMA (**figura 3**).



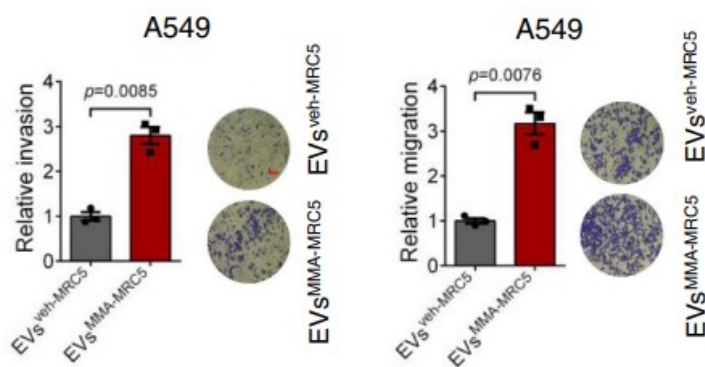
**Figura 3:** immunoblot che mostra come varia l'espressione dei marcatori EMT dopo 5 giorni in cui le cellule A549 sono cresciute a contatto con  $CM^{veh-MRC5}$  (controllo) e  $CM^{MMA-MRC5}$ . La vinculina è utilizzata come controllo del caricamento. Le cellule tumorali trattate con  $CM^{MMA-MRC5}$  mostrano un aumento dei marcatori EMT.

<sup>5</sup> Lo stesso è stato fatto con le cellule A375 con analoghi risultati, da qui in avanti tratterò solo gli esperimenti fatti con le cellule A549 in quanto hanno portato sempre alle stesse conclusioni.



Una volta determinato che i CAF attivati da MMA sono in grado di agire sulle cellule tumorali si è cercato di capire come questo fosse possibile. Sono state quindi isolate le vescicole dal mezzo in cui sono stati coltivati fibroblasti MRC5 sia con un controllo ( $EV^{veh-MRC5}$ ) che con MMA ( $EV^{MMA-MRC5}$ ) e con queste si sono trattate le cellule tumorali A549: si è ottenuto nuovamente un aumento dei marcatori EMT, in modo analogo a quello ottenuto in **figura 3**, confermando che le molecole prodotte dai CAF che agiscono sulle cellule tumorali sono trasportate in vescicole. Queste vescicole sono poi state raccolte e isolate: non si sono riscontrate differenze nel numero e nelle dimensioni delle vescicole nei due casi quindi il meccanismo di azione delle  $EV^{MMA-MRC5}$  è da attribuire al loro contenuto.

Data la capacità delle vescicole prodotte dai CAF di indurre EMT, indice di aggressività, le cellule tumorali A549 trattate con  $EV^{MMA-MRC5}$  hanno anche mostrato una maggiore capacità di invasione e di migrazione nei saggi *transwell* rispetto alle stesse cellule tumorali trattate con  $EV^{veh-MRC5}$  (**figura 4**).

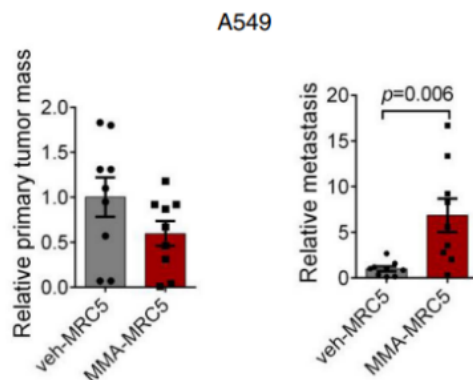


**Figura 4:** saggio di migrazione e invasione transwell. Sia la migrazione che l'invasione risultano aumentati nelle cellule tumorali A549 in seguito al trattamento con le vescicole  $EV^{MMA-MRC5}$  rispetto alla condizione in cui le cellule tumorali A549 sono trattate con  $EV^{veh-MRC5}$ .

Si è poi osservato che, quando cellule tumorali A549 cresciute con vescicole isolate dal mezzo di crescita di fibroblasti MRC5 trattati con MMA sono state coltivate in mezzi normali, queste si sono riconvertite in un fenotipo epiteliale dopo 5 giorni: questo evidenzia la plasticità e la reversibilità dell'EMT.

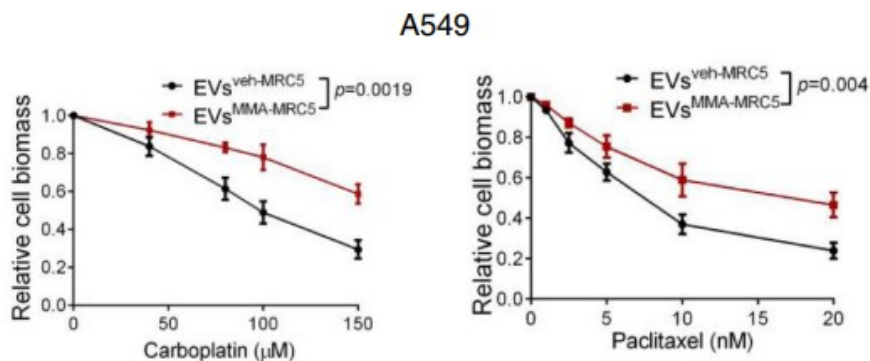
L'EMT ha un ruolo chiave nell'invasività e a conferma di ciò sono state co-iniettate cellule tumorali A549 con fibroblasti MRC5 trattati con un controllo o con MMA in topi: la capacità delle cellule tumorali di metastatizzare, in presenza di fibroblasti trattati con MMA, è notevolmente maggiore rispetto alla situazione in cui i fibroblasti sono trattati con un controllo.

Interessante è anche notare che la massa primaria del tumore sia rimasta per lo più invariata (**figura 5**), a conferma che i CAF inducono un fenotipo aggressivo più che proliferativo.



**Figura 5:** misurazione della massa primaria del tumore e delle metastasi dopo 6 settimane dall'iniezione sottocutanea in topi. Quello che si nota è che nei topi co-iniettati con cellule tumorali e i fibroblasti trattati con MMA si ha un notevole aumento di formazione di metastasi.

Un altro dato emerso dall'analisi sulle colture cellulari è che, oltre ad avere un'aumentata capacità di invasione e di migrazione, le cellule tumorali A549 trattate con  $EV^{MMA-MRC5}$  mostrano una maggiore resistenza a farmaci antitumorali specifici (**figura 6**), collegando l'aggressività ad una minore risposta terapeutica.



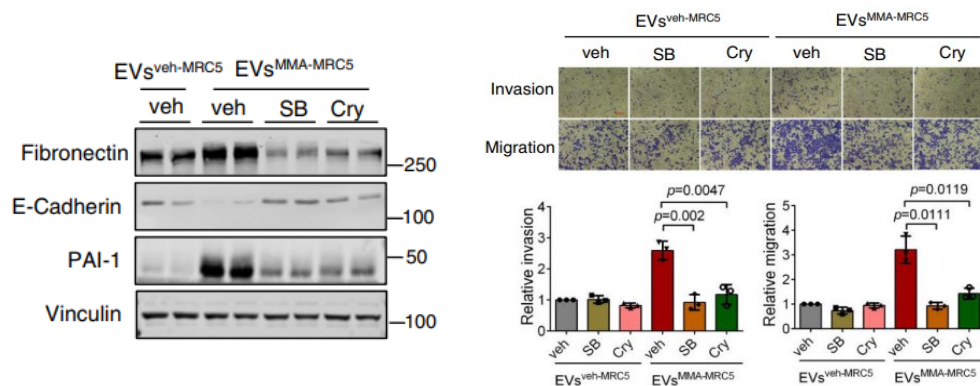
**Figura 6:** saggio di resistenza ai farmaci effettuato nelle cellule tumorali A549 utilizzando carboplatino e paclitaxel. La biomassa delle cellule, sotto trattamento farmacologico, è maggiore nel caso di cellule tumorali A549 trattate con  $EV^{MMA-MRC5}$  rispetto che a quelle trattate con  $EV^{veh-MRC5}$ : ad una maggiore invasività e capacità di migrare, conferite dalle molecole secrete in vescicole dai CAF, corrisponde anche una maggiore resistenza ai farmaci. Il risultato è analogo per entrambi i farmaci.

#### 4.3 I CAF attivati dall'MMA, mediante la secrezione di IL-6 in vescicole, mediano la segnalazione metastatica nelle cellule tumorali

Per determinare in che modo le vescicole prodotte dai CAF attivati dall'MMA prodotto dal tumore potessero guidare la progressione tumorale, dato che non è stato riscontrato un cambiamento nel numero e nella dimensione delle vescicole secrete dai fibroblasti nella condizione in cui sono trattati con MMA rispetto alla condizione di controllo, sono state eseguite analisi proteomiche sulle vescicole secrete dai fibroblasti nelle due condizioni. Da questa analisi è risultato che, nelle

vescicole provenienti dai fibroblasti trattati con MMA, c'era una sovra espressione della citochina IL-6 rispetto alle vescicole provenienti da fibroblasti trattati con un controllo. Si è inoltre visto che le vie di segnalazione IL-6/JAK/STAT3 e TGFβ erano maggiormente attive nelle cellule A549 dopo il trattamento con le vescicole provenienti da fibroblasti MRC5 trattati con MMA.

Il passo successivo è stato determinare il funzionamento di queste cascate di segnalazione per capire come l'IL-6 prodotta dai CAF possa indurre un fenotipo più invasivo e in grado di dare metastasi agendo attraverso l'EMT. Per farlo sono stati utilizzati nelle cellule A549 degli inibitori delle due vie ovvero SB431542 (SB) per TGFβR e cryptotanshinone (Cry) per JAK: in questo modo sono diminuiti i marcatori dell'EMT nelle cellule tumorali trattate con vescicole  $EV^{MMA-MRC5}$  con una conseguente diminuzione dell'invasione e della migrazione (**figura 7 a-b**).



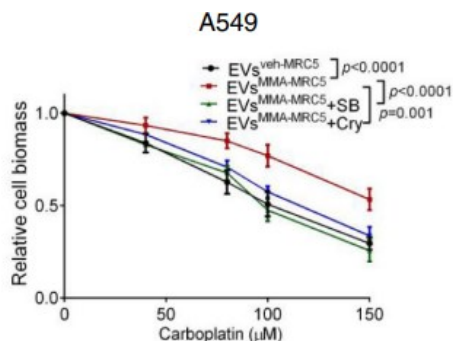
**Figura 7a**

**Figura 7b**

**Figura 7: a)** immunoblot che mostra i marcatori EMT in cellule A549 dopo aver inibito in modo specifico le vie di segnalazione attivate da IL-6 in varie condizioni. Le cellule A549 trattate con  $EV^{MMA-MRC5}$  + SB e  $EV^{MMA-MRC5}$  + Cry mostrano una diminuzione dei marcatori EMT rispetto alla condizione  $EV^{MMA-MRC5}$  a conferma del fatto che sono queste vie quelle attivate dalle molecole secrete dai CAF. **b)** Saggio di invasione e migrazione transwell di cellule tumorali A549 trattate con  $EV^{MMA-MRC5}$ ,  $EV^{veh-MRC5}$  e, in entrambe le condizioni, con inibitori delle vie di segnalazione attivate da IL-6. Le cellule tumorali trattate con  $EV^{veh-MRC5}$  non mostrano grandi differenze nelle varie condizioni (veh, SB e Cry) in quanto i fibroblasti di controllo non secernono IL-6 e di conseguenza non vanno ad attivare, tramite le loro vescicole, le vie di segnalazione nelle cellule tumorali. Nelle cellule tumorali trattate con  $EV^{MMA-MRC5}$  si vede una diminuzione di invasione e migrazione nella condizione in cui vengono usati SB e Cry rispetto a quella di controllo perché in questo caso le vie di segnalazione sono state attivate da IL-6 e quindi si vede l'effetto degli inibitori.

Un risultato analogo è stato ottenuto effettuando il "knockdown" di IL6R nelle cellule tumorali, suggerendo che l'attivazione di IL6R funzioni a monte della segnalazione delle vie considerate.

L'inibizione di queste vie ha inoltre dimostrato un aumento alla sensibilizzazione a farmaci antitumorali specifici nelle cellule A549 (**figura 8**).

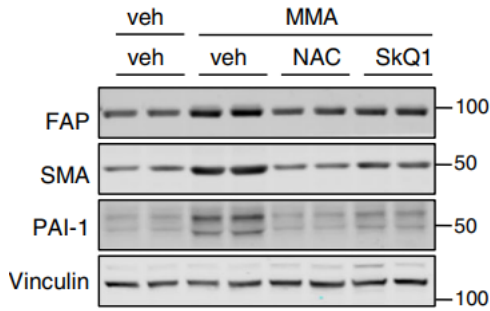


**Figura 8:** saggio di resistenza al carboplatino. Sono state trattate cellule tumorale A549 rispettivamente con vescicole:  $EV^{veh-MRC5}$ ,  $EV^{MMA-MRC5}$ ,  $EV^{MMA-MRC5} + SB$ ,  $EV^{MMA-MRC5} + Cry$ . Il trattamento delle cellule A549 con  $EV^{MMA-MRC5}$  e SB,  $EV^{MMA-MRC5}$  e Cry è simile a quello di controllo in cui le cellule A549 sono trattate con  $EV^{veh-MRC5}$  a dimostrazione del fatto che andare a bloccare queste vie, quando sono attivate da fibroblasti esposti a MMA, va a diminuire la resistenza ai farmaci antitumorali specifici. Nell'unica condizione in cui c'è MMA e non ci sono inibitori delle vie che questo attiva tramite IL-6 nelle cellule tumorali, la massa cellulare relativa è più alta e ciò sta a significare che le cellule, in questa condizione, hanno una maggiore resistenza ai farmaci.

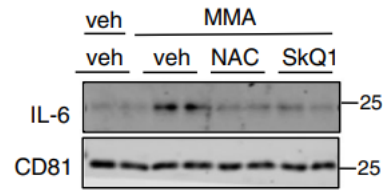
#### 4.4 MMA attiva i fibroblasti attraverso la segnalazione NF-κB e TGFβ mediata da specie reattive dell'ossigeno

Infine è stato determinato quale fosse il meccanismo alla base di tutto questo processo, ovvero come l'MMA fosse in grado di attivare i CAF a secernere molecole per uno sviluppo tumorale aggressivo. Per fare questo è stata fatta una analisi di RNA-Seq sui fibroblasti MRC5 di controllo e trattati con MMA: analisi di arricchimento funzionale hanno mostrato una sovra espressione dei geni coinvolti nelle vie di segnale TGFβ e NF-κB e un aumento nella risposta allo stress ossidativo nei fibroblasti trattati con MMA rispetto a quelli di controllo.

L'MMA è in grado di aumentare i livelli di specie reattive dell'ossigeno (ROS) attraverso un meccanismo specifico o attraverso l'attivazione di processi in cui sono coinvolti i ROS: la questione non è ancora chiara ma in entrambi i casi i ROS hanno un ruolo importante nell'attivazione dei CAF andando ad agire sulle vie TGFβ e NF-κB. A conferma di questo, il trattamento dei fibroblasti con antiossidanti come N-acetil-cisteina (NAC) e SkQ1, ha inibito l'attivazione delle vie TGFβ e NF-κB e di conseguenza ha diminuito i marcatori CAF e la secrezione di IL-6 nelle vescicole (**figura 9 a-b**): nonostante la presenza di MMA i fibroblasti non hanno assunto un fenotipo CAF.



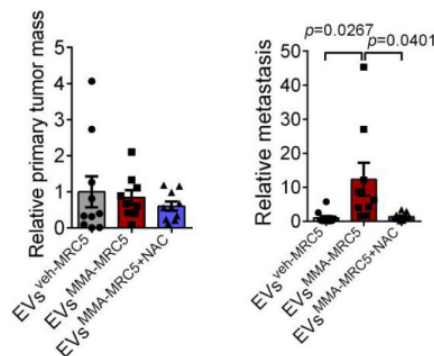
**Figura 9a**



**Figura 9b**

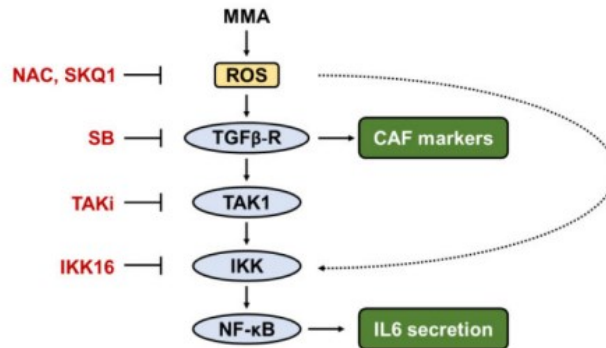
**Figura 9: a)** immunoblot che mostra i marcatori CAF di fibroblasti MRC5 trattati con un controllo, con MMA, con MMA + NAC e con MMA + SkQ1. Le condizioni in cui i fibroblasti sono trattati con MMA e antiossidanti mostrano un profilo simile ai fibroblasti di controllo (non trattati con MMA e antiossidanti). Questo risultato conferma che andando a diminuire la concentrazione di ROS tramite gli antiossidanti, anche in presenza di MMA, non si vanno ad attivare le vie che portano i fibroblasti ad assumere un fenotipo CAF. Solo nella condizione in cui i fibroblasti sono trattati solo con MMA abbiamo una maggiore espressione di marcatori CAF. **b)** immunoblot che mostra la quantità di IL-6 presente nelle vescicole secrete da fibroblasti MRC5 di controllo e dopo il trattamento con MMA da solo o in combinazione con NAC o SkQ1. La condizione in cui i fibroblasti sono trattati con MMA e con antiossidanti mostra livelli di IL-6 simili alla condizione di controllo in cui i fibroblasti non sono trattati con MMA e antiossidanti. Analogamente a quanto visto nella figura 9a, il risultato mostra che andando a diminuire la concentrazione di ROS, anche in presenza di MMA, non si vanno ad attivare le vie che portano i fibroblasti a secernere IL-6. Solo nella condizione in cui i fibroblasti sono trattati solo con MMA c'è un aumento della presenza di IL-6.

Il trattamento dei fibroblasti MRC5 con antiossidanti ha inibito anche *in vivo* la capacità delle vescicole secrete dagli stessi di indurre EMT, di aumentare la resistenza ai farmaci e di indurre metastasi nelle cellule tumorali A549 (**figura 10**), evidenziando l'importanza dei ROS nell'attivazione dei CAF.



**Figura 10:** formazione di metastasi e massa tumorale primaria in topi dopo l'iniezione sottocutanea di cellule A549 trattate con  $EV^{veh-MRC5}$ ,  $EV^{MMA-MRC5}$  e con  $EV^{MMA-MRC5} + NAC$ . Si può notare come nella formazione di metastasi il trattamento dei fibroblasti con NAC insieme a MMA ha dato lo stesso risultato della situazione di controllo, confermando che se si diminuisce la concentrazione di ROS, anche in presenza di MMA, le vie di segnale che attivano i fibroblasti a secernere IL-6 vengono a mancare.

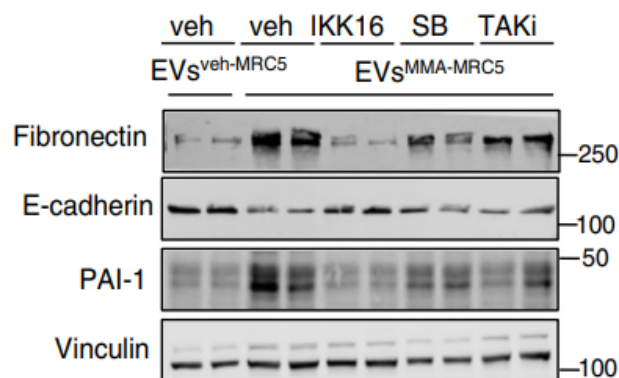
È stato dimostrato in precedenza che l'attivazione di TGF $\beta$  porta alla fosforilazione sequenziale di TAK1, IKK e infine all'attivazione a valle di NF- $\kappa$ B (**figura 11**).



**Figura 11:** vie di segnale attivate dall'MMA nei fibroblasti.

Interessante è stato notare che l'inibizione, tramite SB43152 (SB), di TGF $\beta$ R ha soppresso l'induzione dei marcatori CAF che invece non si è verificata inibendo rispettivamente, tramite Takinib e IKK16, TAK1 e IKK: la capacità dei fibroblasti di indurre marcatori CAF è determinata da TGF $\beta$  più che dagli intermedi a valle.

La secrezione e il caricamento di IL-6 invece si è dimostrata essere dipendente dalla via di segnalazione NF- $\kappa$ B: l'inibizione di TGF $\beta$ R, TAK1 e IKK sono state tutte, singolarmente, in grado di ridurre la concentrazione di IL-6 presente nelle vescicole secrete dai CAF. L'inibizione di questi tre intermedi ha infatti, conseguentemente ad un carico minore di IL-6 nelle vescicole secrete dai CAF, determinato una ridotta attivazione della via IL-6/JAK/STAT3 nelle cellule tumorali A549 con una conseguente diminuzione dei marcatori dell'EMT (**figura 12**).



**Figura 12:** immunoblot che mostra i marcatori EMT in cellule tumorali A549 trattate con EV<sup>veh-MRC5</sup>, EV<sup>MMA-MRC5</sup> e EV<sup>MMA-MRC5</sup> provenienti da fibroblasti trattati con specifici inibitori delle vie di segnalazione che l'MMA è in grado di attivare nei fibroblasti stessi.

Riassumendo, il fenotipo CAF indotto da MMA è regolato da TGF $\beta$  separatamente dal segnale NF- $\kappa$ B che determina la secrezione di IL-6.

La riduzione dell'attivazione della via IL-6/JAK/STAT3 nelle cellule tumorali A549 in questo caso è conseguente ad una diminuita secrezione di IL-6 da parte dei fibroblasti trattati con MMA. Questo avviene sia in presenza di antiossidanti che, abbassando la concentrazione di ROS indotta da MMA, inibiscono interamente o parzialmente l'attivazione dei fibroblasti stessi, sia in presenza degli inibitori delle vie di segnalazione attivate nei fibroblasti in seguito all'esposizione ad MMA. In entrambi i casi, analogamente a quanto visto nel paragrafo precedente trattando le cellule tumorali con inibitori specifici della via IL-6/JAK/STAT, si ha una diminuzione della resistenza ai trattamenti farmacologici mirati.

La **figura 12** ci permette di fare un'altra osservazione: si nota che l'inibizione di IKK ha un effetto maggiore dell'inibizione di TGF $\beta$  e di TAK1 sulla diminuzione dei marcatori EMT. Questo porta a concludere che l'attivazione a valle della via di segnalazione di TGF $\beta$ , quindi NF- $\kappa$ B, è in parte attivata in modo indipendente da quella appena vista. Infatti, anche se vengono inibiti TGF $\beta$ R e TAK1, si ha comunque un piccolo carico di IL-6 nelle vescicole derivante dall'attivazione indipendente di IKK che si ripercuote poi nella capacità di indurre EMT nelle cellule tumorali.





## 5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Complessivamente i risultati mostrano come siano complesse le interazioni che avvengono nel microambiente tumorale e come ci sia uno scambio di sostanze secrete dalle cellule che vanno ad influenzarsi, in modo anche reversibile, l'una con l'altra. Tutto questo dimostra la grande plasticità del tessuto, fattore fondamentale che rende possibile lo sviluppo e la progressione dei tumori. Gli autori hanno dimostrato che l'MMA, la cui produzione è aumentata con l'invecchiamento e dal tumore stesso, è un metabolita in grado di promuovere l'invasività e la metastatizzazione dei tumori. Nello specifico questo oncometabolita agisce attivando delle vie di segnale, mediate dai ROS, nei fibroblasti dello stroma che assumono così un fenotipo CAF e rilasciano delle sostanze, tra cui la citochina IL-6, che guidano uno sviluppo aggressivo a livello delle cellule tumorali attivando in queste specifiche vie di segnale.

I fattori principali su cui ci si è concentrati sono stati l'espressione di marcatori EMT, la capacità di invasione e di migrazione e la resistenza ai farmaci: tutti questi fattori se aumentati portano ad un fenotipo tumorale aggressivo. Infatti, l'aggressività tumorale non è da attribuire interamente alla massa tumorale primaria, quindi alla capacità proliferativa delle cellule, ma alla capacità di invadere i tessuti e di formare metastasi. In tutti i casi in cui le cellule tumorali sono cresciute con fibroblasti esposti all'MMA si è osservato un aumento dei marcatori EMT che ha permesso, grazie all'acquisizione di un fenotipo mesenchimale, un aumento dell'invasione e della migrazione delle cellule tumorali. Inoltre, tutte le volte che si sono trovati marcatori EMT aumentati, è emersa anche una maggiore resistenza ai farmaci antitumorali specifici. Al contrario, tutte le volte in cui si è andati ad interrompere in qualche punto il processo comunicativo tra cellule tumorali e i CAF, e viceversa, si è ottenuta una diminuzione dei marcatori EMT con una conseguente sensibilizzazione ai farmaci.

L'MMA non agisce solo attivando i fibroblasti stromali e rimodellando la matrice extracellulare a favore di una crescita tumorale aggressiva ma è anche in grado di regolare i programmi genetici associati al destino cellulare e a geni coinvolti nella resistenza ai farmaci nelle cellule tumorali stesse. L'MMA è infatti un regolatore positivo in grado di sovra regolare il fattore di trascrizione HMG box (SOX) nelle cellule A549: nello specifico la via di segnalazione TGF $\beta$  riesce ad indurre SOX4 ovvero uno dei principali regolatori dell'EMT (2).

Tutto questo sostiene la complessa rete di interazioni che si vengono a creare nelle cellule tumorali, soprattutto nei tumori aggressivi, sia con le altre cellule ma anche con loro stesse per automantenersi ed aumentare la propria aggressività agendo anche sul microambiente tumorale. Bisogna quindi porre la giusta attenzione al microambiente tumorale per riuscire a capire come possano assumere fenotipi così aggressivi certi tipi di tumore: negli esperimenti affrontati infatti il focus è posto sull'interazione tra fibroblasti e cellule tumorali.

Oltre ai risultati ottenuti *in vitro* dalle colture cellulari, interessanti sono stati gli esiti *in vivo* nei topi che hanno confermato la capacità dell'MMA di indurre maggiore aggressività nelle cellule tumorali attraverso l'attivazione dei CAF. Nonostante il modello sottocutaneo utilizzato sia semplice e veloce da eseguire e permetta facilmente di seguire la crescita tumorale, presenta degli svantaggi perché la sede di iniezione non sempre rispecchia lo scenario fisiologico dell'organo in cui si sviluppa il tumore. Compatibilmente con le metodiche disponibili per i vari organi sarebbe interessante effettuare questo test nei topi utilizzando un modello ortotopico, ovvero un modello in cui le cellule tumorali vengono impiantate chirurgicamente o iniettate nel sito di origine del tumore in modo che si abbia un microambiente tumorale completo che rispecchi le condizioni presenti nell'organo di sviluppo. I modelli ortotopici producono più frequentemente metastasi spontanee rispetto a quelli sottocutanei: effettuare questo test permette di vedere se ci sono state eventuali sottostime nei risultati ottenuti. Inoltre, questo modello si presta di più, proprio per le condizioni di sviluppo del tumore, per eseguire test sui farmaci <sup>(5)</sup>. I test sui farmaci nell'articolo esaminato sono stati eseguiti solo sulle colture cellulari, probabilmente perché lo scopo principale dello studio sui topi era vedere la metastatizzazione, che ha richiesto il loro sacrificio. Tuttavia, sarebbe interessante vedere se gli effetti di resistenza ai farmaci visti nelle colture cellulari si verificano anche *in vivo*.

Concludendo possiamo dire che oltre all'invecchiamento, all'esposizione a mutageni, alla dieta e allo stile di vita, anche i cambiamenti che avvengono fisiologicamente o patologicamente a livello metabolico giocano un ruolo fondamentale nella formazione di un microambiente tumorale. Riuscire a comprendere i meccanismi alla base del funzionamento metabolico, che possono portare allo sviluppo di un ambiente pro-tumorale, e i meccanismi che consentono al tumore una volta formato di evolvere verso una forma aggressiva, possono permettere di aprire le porte a nuovi bersagli terapeutici. Dato che sono state già ottenute informazioni sull'evoluzione di questi tumori sui topi, i modelli murini possono continuare ad essere la chiave per lo studio di farmaci che vanno ad interferire con le vie di segnalazione che si è visto essere attivate nelle cellule tumorali e nei CAF, per sviluppare procedure diagnostiche e terapeutiche utilizzabili in uomo.

Agire quindi sul mantenimento di un corretto metabolismo, fattore che può essere fortemente aiutato anche dall'alimentazione, e sull'inibizione delle vie che disregolano le cellule tumorali, che attivano i CAF e che attivano le cellule tumorali grazie ai CAF, potrebbe permettere non solo di migliorare la qualità di vita delle persone affette da questo tipo di tumori ma anche di abbassare il tasso di mortalità a loro associato, dato prevalentemente dallo sviluppo di metastasi.

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. Zhou X, Cui Y, Han J. Methylmalonic acidemia: Current status and research priorities. *IRDR*. 2018;7(2):73-78. doi:10.5582/irdr.2018.01026
2. Gomes AP, Ilter D, Low V, et al. Age-induced accumulation of methylmalonic acid promotes tumour progression. *Nature*. 2020;585(7824):283-287. doi:10.1038/s41586-020-2630-0
3. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(3):178-196. doi:10.1038/nrm3758
4. Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA. Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell*. 2017;168(4):670-691. doi:10.1016/j.cell.2016.11.037
5. Szadvari I, Krizanova O, Babula P. Athymic nude mice as an experimental model for cancer treatment. *Physiol Res*. 2016;65(Suppl 4):S441-S453. doi:10.33549/physiolres.933526





# Tumor-produced and aging-associated oncometabolite methylmalonic acid promotes cancer-associated fibroblast activation to drive metastatic progression

Received: 18 January 2022

Accepted: 5 October 2022

Published online: 20 October 2022

Check for updates

Zhongchi Li<sup>1,2,11</sup>, Vivien Low<sup>1,2,11</sup>, Valbona Luga<sup>1,3</sup>, Janet Sun<sup>1,3</sup>, Ethan Earlie<sup>1,4</sup>, Bobak Parang<sup>1,2,3</sup>, Kripa Shobana Ganesh<sup>1,5</sup>, Sungyun Cho<sup>1,2</sup>, Jennifer Endress<sup>1,5</sup>, Tanya Schild<sup>1,5,9</sup>, Mengying Hu<sup>1,6</sup>, David Lyden<sup>1,6</sup>, Wenbing Jin<sup>7</sup>, Chunjun Guo<sup>7</sup>, Noah Dephoure<sup>1,5</sup>, Lewis C. Cantley<sup>1,3,10</sup>, Ashley M. Laughney<sup>1,4,8</sup> & John Blenis<sup>1,2,5</sup> ✉

The systemic metabolic shifts that occur during aging and the local metabolic alterations of a tumor, its stroma and their communication cooperate to establish a unique tumor microenvironment (TME) fostering cancer progression. Here, we show that methylmalonic acid (MMA), an aging-increased oncometabolite also produced by aggressive cancer cells, activates fibroblasts in the TME, which reciprocally secrete IL-6 loaded extracellular vesicles (EVs) that drive cancer progression, drug resistance and metastasis. The cancer-associated fibroblast (CAF)-released EV cargo is modified as a result of reactive oxygen species (ROS) generation and activation of the canonical and non-canonical TGF $\beta$  signaling pathways. EV-associated IL-6 functions as a stroma-tumor messenger, activating the JAK/STAT3 and TGF $\beta$  signaling pathways in tumor cells and promoting pro-aggressive behaviors. Our findings define the role of MMA in CAF activation to drive metastatic reprogramming, unveiling potential therapeutic avenues to target MMA at the nexus of aging, the tumor microenvironment and metastasis.

Metastasis underlies mortality in the majority of solid-cancer tumors, including lung cancer, the leading cause of cancer death, and melanoma, in which the 5-year survival rate is <15% in patients with metastatic disease<sup>1</sup>. As a problem of aging, metastasis is the number one cause of death in people 60–79 years old and represents a direct avenue to steer interventions for improving cancer survival and extending overall lifespans<sup>2</sup>. Toward this end, much investigative effort continues to focus on mutational, epigenetic, and metabolomic changes within the cancer cell that abet the metastatic process. In this arena, we discovered that methylmalonic acid (MMA), a byproduct of propionate metabolism, is increased in the serum of elderly people and contributes to acquisition of aggressive properties in tumor cells,

uncovering a systemic cause for the link between old age and negative cancer outcomes. In addition to the age-dependent increase in circulatory MMA, we have also demonstrated that tumor cells dysregulate propionate metabolism in order to increase local MMA accumulation, driving cancer progression in an autocrine manner<sup>3</sup>.

Considering that MMA is increased both in the aging body and locally through tumor production, the next question was how these high local concentrations of MMA could function in a paracrine fashion. The influence of the tumor microenvironment (TME) on metastatic progression is inextricable from the equation. Within the heterogeneous and dynamic TME network, the exchange of secreted factors such as hormones, enzymes, growth factors, cytokines and

A full list of affiliations appears at the end of the paper. ✉ e-mail: [job2064@med.cornell.edu](mailto:job2064@med.cornell.edu)

metabolites all facilitate a cooperative tumorigenic and metastatic process between tumor and stroma<sup>4</sup>. Cancer-associated fibroblasts (CAFs) represent critical players in the formation of a favorable TME for cancer progression. In addition to extracellular matrix (ECM) deposition and remodeling, CAFs secrete cytokines, growth factors, and metabolites that influence the behavior and function of tumor cells as well as other stromal components. The concentrations, combinations and efficacy of these secreted molecules can be specifically regulated by their delivery through extracellular vesicles (EVs), although the mechanisms controlling these parameters are not fully understood<sup>5</sup>. In tumor cells, CAF-secreted messengers influence tumor growth, metastasis and drug resistance through multiple underlying processes, including inhibiting apoptosis pathways, induction of stemness programs, or epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)<sup>6,7</sup>. Many of the traits that epithelial-like tumor cells acquire through EMT enhance successful remodeling of their surrounding ECM, support invasion through tissue, and promote intravasation across the endothelial barrier into the bloodstream. This is supported by histopathological studies showing that cells at the invasive front of tumors exhibit an EMT phenotype<sup>8,9</sup>.

In the present study, we show that MMA, increased in the TME by aging as well as by tumor production, activates stromal fibroblasts to CAFs and induces a secretory phenotype. In turn, EVs secreted by MMA-induced CAFs, harboring IL-6 and other factors, promote an EMT in tumor cells, fostering the acquisition of aggressive traits including drug resistance and increased metastatic formation.

## Results

### MMA secreted from tumor cells activates fibroblasts in the tumor microenvironment

Aberrations in the enzymes downstream of methylmalonyl-CoA in the propionate metabolism pathway, namely methylmalonyl-CoA mutase (MUT), methylmalonyl-CoA epimerase (MCEE), methylmalonic aciduria type A protein (MMAA), or cob(II)yrinic acid a,c-diamide adenosyltransferase (MMAB) result in pathogenic systemic MMA accumulation in methylmalonic acidemias<sup>10–13</sup>, and drive cancer drug resistance and metastasis through increased MMA accumulation in vitro and in vivo<sup>3</sup> (Fig. 1a). We profiled the transcripts of these metabolic enzymes in individual cells obtained from resected human lung cancer primary tumors and metastases, and found that tumor cells with reduced expression of these genes were enriched in mesenchymal subpopulations (Fig. 1a, b). Given this, and our previous findings that metastatic inducers drive MMA production and pro-aggressive effects on tumors through dysregulation of propionate metabolism, we wondered if tumor-produced MMA might also act on other cell types in the TME<sup>3</sup>. Fibroblasts comprise the major component of the TME, and in some solid tumors even outnumber malignant cells<sup>14</sup>. We knocked down *MUT* in A549 lung carcinoma and A375 melanoma cells to simulate MMA accumulation by altered propionate metabolism during early steps of metastasis, and co-cultured these cells with MRC5 lung and BJ dermal fibroblasts, respectively (Fig. 1c–e). Five days of co-culture markedly increased CAF markers in the fibroblasts, suggesting that tumor-produced MMA is secreted and activates fibroblasts in the stroma (Fig. 1f). Conversely, blocking MMA production in A375 cells by knockdown of *PCCA*, a component of propionyl-CoA-carboxylase, repressed their ability to induce the activation and infiltration of fibroblasts in the tumor in vivo (Fig. s1a–c). Notably, an RNA-sequencing dataset of 501 whole tumors from patient lung squamous cell carcinomas showed a correlation between low *MUT*, *MCEE*, *MMAA* and *MMAB* levels (indicating high MMA) and high expression of cancer-associated fibroblast markers *ACTA1* (encoding for SMA) and *FAP* (Fig. s1d), suggesting that human tumors with greater levels of MMA do indeed harbor a great proportion of CAFs.

We have previously demonstrated that MMA in the serum is largely encapsulated in lipid vesicles, allowing for accelerated entry

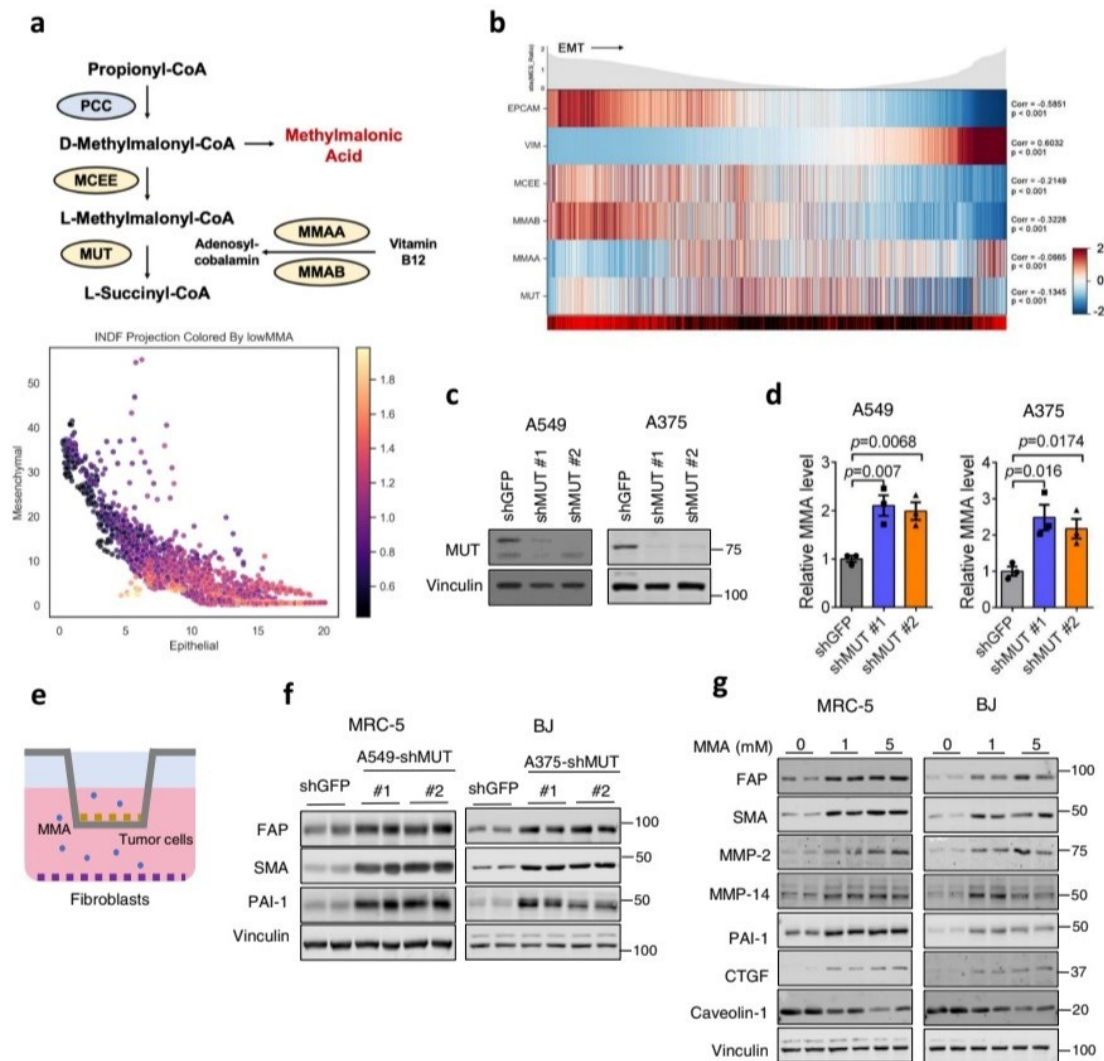
into cells at much lower concentrations compared to free MMA<sup>15</sup>. When we isolated extracellular lipid vesicles from the conditioned media (CM) of *MUT*-knocked down tumor cells (EVs<sup>shMUT-A549</sup>), we found that they indeed carried more MMA compared to control vesicles (EVs<sup>shGFP-A549</sup>), and could induce CAF markers when used to treat fibroblasts (Fig. s1e–f). Depletion of these vesicles from the CM of *MUT*-knocked down cells abolished its ability to induce CAF markers in fibroblasts, confirming that tumor-produced MMA, like the MMA in the serum of elderly people, is delivered and acts on cells through EVs (Fig. s1g).

Treatment of MRC-5 and BJ fibroblasts with exogenous MMA reproduced the effect of co-culture with or EVs from *MUT*-knockdown tumor cells on CAF marker expression in a dose-dependent manner (Fig. 1g). The ability of exogenous MMA to induce CAF markers in fibroblasts was similar to that of the CM and lipid vesicles from *MUT*-knocked down tumor cells, as well as other known CAF inducers, including TGF $\beta$  (Fig. s1h). Proliferation was not affected by 1 mM MMA treatment, and mildly decreased under 5 mM of MMA (Fig. s1i). We confirmed that MMA activation of CAFs was not simply due to decreased pH or altered TCA cycle flux, as other acids from the propionate metabolism pathway were unable to reproduce the phenotype (Fig. s1j). Intriguingly, MMA also induced CAF production of matrix metalloproteinases (Fig. 1f), which contribute to the ECM remodeling that promotes intravasation of tumor cells into the bloodstream in early stages of metastasis<sup>16</sup>.

### MMA-treated fibroblasts secrete EVs to promote pro-aggressive reprogramming in tumor cells

To determine if the secretome of MMA-activated CAFs might direct tumor cell behavior, we cultured tumor cells with CM from vehicle- or MMA-treated fibroblasts (CM<sup>veh-MRC5/BJ</sup> and CM<sup>MMA-MRC5/BJ</sup>) and observed a marked increase in markers of EMT (Fig. 2a). In addition, co-injection of A549 tumor cells with MMA-treated MRC5 fibroblasts into mice significantly increased the ability of tumor cells to metastasize, indicating that one or more secreted factors from MMA-activated CAFs promotes a pro-metastatic phenotype in cancer cells (Fig. 2b).

Next, we aimed to identify the components of the CM secreted by MMA-treated fibroblasts that was driving the EMT phenotype in tumor cells. EVs are loaded with signaling molecules and genetic material, and function as essential signaling mediators in the TME<sup>17,18</sup>. Considering that MMA is delivered from tumor cells to fibroblast in EVs, we looked to see whether the fibroblast messengers reciprocally driving EMT in tumor cells were also contained in EVs. From MRC-5 lung and BJ dermal fibroblasts, we isolated EVs from the CM after vehicle or MMA treatment (EVs<sup>veh-MRC5</sup> and EVs<sup>veh-BJ</sup>, or EVs<sup>MMA-MRC5</sup> and EVs<sup>MMA-BJ</sup>, respectively) (Fig. 2c). We did not observe a significant difference in the number or size of EVs secreted by MMA-treated fibroblasts (EVs<sup>MMA-MRC5/BJ</sup>) compared to those secreted by vehicle-treated fibroblasts (EVs<sup>veh-MRC5/BJ</sup>) (Fig. S2a, b). Survey of extracellular vesicle marker proteins confirmed the purity of these EVs (Fig. S2c). To determine if the CAF-secreted factor driving EMT in tumor cells was being delivered through these structures, we then added EVs<sup>veh-MRC5/BJ</sup> or EVs<sup>MMA-MRC5/BJ</sup> to their tissue-matched A549 or A375 tumor cells (Fig. 2c). Upon treatment of tumor cells with EVs<sup>MMA-MRC5</sup>, we once again observed an increase in EMT markers (Fig. 2d). In contrast, the supernatant from the CM<sup>MMA-MRC5/BJ</sup> after isolation of the EVs lost its ability to induce this effect (Fig. S3a). We noted that when A549 tumor cells treated with isolated EVs<sup>MMA-MRC5</sup> were then cultured in normal media, they converted back to an epithelial phenotype after 5 days, highlighting the plasticity of EMT (Fig. S3b). Importantly, when EVs<sup>MMA-MRC5</sup>-treated tumor cells were released from EVs<sup>MMA-MRC5</sup> treatment, but subsequently co-cultured in the presence of untreated fibroblasts, the tumor cells maintained their aggressive phenotype (Fig. S3b). This underscores the importance of a positive feedback loop between the tumor and stroma, wherein fibroblast activation drives tumor cell aggression, which reciprocally

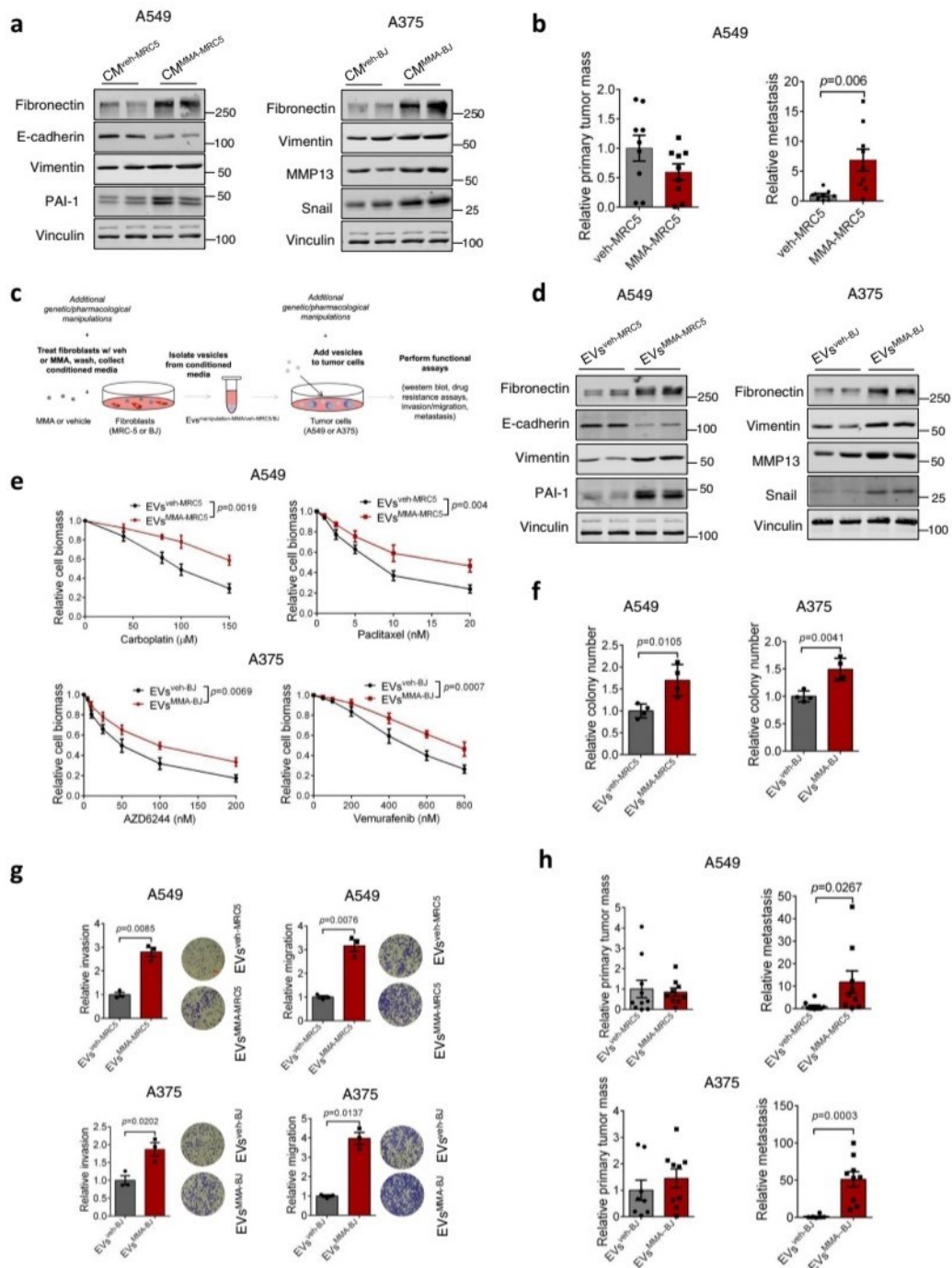


**Fig. 1 | MMA produced by tumor cells promotes a cancer-associated fibroblast phenotype.** **a** Patient-derived tumor cells ( $n = 2537$ ) projected according to imputed Vimentin expression and imputed EPCAM expression. Each cell is colored by average imputed expression of negative regulators of MMA production (MMAA, MMAB, MCEE, and MUT), highlighted in yellow in the diagram depicting propionate metabolism pathway (above). **b** The z-normalized imputed expression of relevant mesenchymal, epithelial, and MMA marker genes is displayed on the heat map ranked by MES Ratio, defined as the log10 transform of the expression ratio of imputed VIM and EPCAM for each cell. The MES Ratio curve along the top of the heat map shows the absolute value of the MES Ratio across the ranked cells. The color bar along the bottom of the heat map shows the sample tissue source (metastasis: red and primary: black). The gene correlation and associated  $p$  values were computed by performing a two-sided spearman test between the normalized

(non-imputed) expression of each gene and the MES Ratio. **c** MUT was knocked down in A549 and A375 tumor cells. Immunoblots show the protein level of MUT in cell lysates. **d** MMA levels in the conditioned medium of the tumor cells were measured, normalized to the total cell number ( $n = 3$  independent experiments, mean  $\pm$  SEM, two-sided paired  $t$ -test). **e** Schematic of the co-culture experiment performed in (f). Tumor cells with shGFP or shMUT knockdown were seeded in a transwell insert, and co-cultured with fibroblasts seeded on the bottom of six-well plates. Fibroblast lysates were collected for immunoblots. **f** Immunoblots measuring CAF markers in MRC-5 fibroblasts co-cultured for 4 days with shMUT-knocked down A549 tumor cells and BJ fibroblasts co-cultured for 4 days with shMUT-knocked down A375 tumor cells. **g** Immunoblots measuring CAF markers in MRC-5 and BJ cell lysates treated with 1 mM or 5 mM of MMA for 5 days.

drives more fibroblast activation, ultimately leading to metastatic progression. A375 and A549 tumor cells treated with EVs<sup>MMA-MRC5/BJ</sup> also exhibited increased resistance to chemotherapeutic and targeted therapy drugs, and displayed increased colony formation in soft agar compared to tumor cells treated with EVs<sup>veh-MRC5/BJ</sup> (Fig. 2e, f). In addition, tumor cells treated with EVs<sup>MMA-MRC5/BJ</sup> exhibited increased invasion and migration ability in transwell assays, and formed more

metastases following a subcutaneous primary tumor implantation in vivo (Fig. 2g, h). Intriguingly, despite having significantly higher metastases formation, tumor cells treated with EVs<sup>MMA-MRC5</sup> did not form significantly larger primary tumors (Fig. 2h). This indicates that the EVs isolated from MMA-activated fibroblasts specifically drive an aggressive, metastatic phenotype in tumor cells, rather than increased cell proliferation.



**IL-6 in fibroblast-secreted EVs mediates tumor cell metastatic signaling**

As we did not see a change in the number and size of EVs induced by MMA treatment, we speculated that the potent tumor cell response observed after MMA treatment could be due to differentially loaded EV cargo. To identify the active factor in EVs from MMA-treated fibroblasts driving metastatic progression, we performed proteomic analysis on EVs<sup>veh-MRC5</sup> and EVs<sup>MMA-MRC5</sup>. One of the most significantly

upregulated secreted proteins in EVs<sup>MMA-MRC5</sup> compared to EVs<sup>veh-MRC5</sup> was IL-6, a pro-inflammatory cytokine that has been implicated in promoting EMT and metastasis (Fig. 3a, Fig. s4a)<sup>19–21</sup>. We also observed that genes driving IL-6/JAK/STAT3 pathway activity were enriched in more mesenchymal cells characterized by downregulation of key genes restricting MMA production from human lung cancer tumor and metastasis tissue samples (Fig. S4b). Indeed, both IL-6/JAK/STAT3-signaling, measured by JAK2 and STAT3 phosphorylation, and TGFβ



**Fig. 2 | EVs secreted by MMA-treated fibroblasts increase tumor aggressiveness.** **a** Immunoblots of A549 and A375 tumor cells after 5-day treatment by conditioned media from vehicle or MMA-treated MRC-5 (for A549) or BJ (for A375) fibroblasts. **b** A mixture of vehicle- or MMA-treated MRC5 with A549 cells were injected subcutaneously. The primary tumor and metastasis formation was measured after 6 weeks ( $n = 9$  mice, mean  $\pm$  SEM, two-sided unpaired  $t$ -test). **c** Experimental scheme. **d–h** Pro-aggressive properties in A549 and A375 tumor cells treated with EVs<sup>veh-MRC5/BJ</sup> or EVs<sup>MMA-MRC5/BJ</sup> from MRC-5 (for A549) or BJ fibroblasts (for A375), evaluated by immunoblots measuring EMT marker expression (**d**), drug resistance assays using carboplatin and paclitaxel for A549 cells, and

vemurafenib and AZD6244 for A375 cells (**e**;  $n = 3$  independent experiments, mean  $\pm$  SEM, two-way ANOVA), colony formation assays for 3 weeks (**f**;  $n = 4$  independent experiments, mean  $\pm$  SEM, two-sided paired  $t$ -test), transwell invasion and migration assays (**g**; red scale bar indicates 100  $\mu$ m,  $n = 3$  independent experiments, mean  $\pm$  SEM, two-sided paired  $t$ -test) and measurement of primary tumor and metastasis formation 5 weeks after subcutaneous injection into mice (**h**;  $n = 10$  mice for A549 EVs<sup>veh-MRC5</sup> group,  $n = 9$  mice for A549 EVs<sup>MMA-MRC5</sup> group,  $n = 8$  mice for A375 EVs<sup>veh-BJ</sup> group,  $n = 9$  mice for A375 EVs<sup>MMA-BJ</sup> group, mean  $\pm$  SEM, two-sided unpaired  $t$ -test).

signaling, measured by phosphorylation of SMAD proteins, were activated in A549 cells upon treatment with EVs<sup>MMA-MRC5</sup> (Fig. 3b). Notably, while EVs<sup>MMA-MRC5</sup> increased Y705 phosphorylation of STAT3, which is the main regulator of cytokine-induced JAK/STAT3 signaling, it did not affect phosphorylation at S727 (Fig. 3b), suggesting a specificity in EVs<sup>MMA-MRC5</sup>-mediated downstream signaling. To determine the necessity of these signaling cascades for the ability of EVs<sup>MMA-MRC5</sup> to drive EMT, we blocked their activation in A549 tumor cells using the TGF $\beta$ R or STAT-3 inhibitors, SB431542 and cryptotanshinone, respectively (Fig. 3c). Inhibition of these pathways effectively blocked EMT induction by EVs<sup>MMA-MRC5</sup> in A549 tumor cells, re-sensitized cells to drug treatment, and suppressed the increase in invasion and migration (Fig. 3d–f). Similarly, knockdown of *IL6R* in tumor cells suppressed both IL-6/JAK/STAT3 and TGF $\beta$  signaling, and suppressed EVs<sup>MMA-MRC5</sup>-induced EMT marker expression, drug resistance, and invasion and migration, suggesting that IL-6R activation functions upstream of TGF $\beta$  pathway signaling in this context (Fig. 3g–j, Fig. S4c). In addition, treating A549 lung tumor cells with tocilizumab, an IL-6R antibody and inhibitor, replicated the effect of *IL6R* knockdown, effectively blocking IL-6/JAK/STAT3 and TGF $\beta$  signaling and suppressing the induction of EMT and drug resistance by EVs<sup>MMA-MRC5</sup> (Fig. S4d–f). Finally, we knocked down *IL6* in MRC-5 fibroblasts before treating them with MMA and isolated their secreted EVs. While IL-6 knockdown in fibroblasts did not have any effect on the ability of MMA to induce CAF marker expression in fibroblasts, it effectively suppressed the ability of EVs<sup>MMA-MRC5</sup> to induce IL-6/JAK/STAT3 and TGF $\beta$  signaling in tumor cells, and was sufficient to abolish the EMT-inducing effect of EVs<sup>MMA-MRC5</sup> and their ability to boost drug resistance, invasion and migration (Fig. s5).

### MMA activates fibroblasts through ROS activated NF- $\kappa$ B and TGF $\beta$ signaling

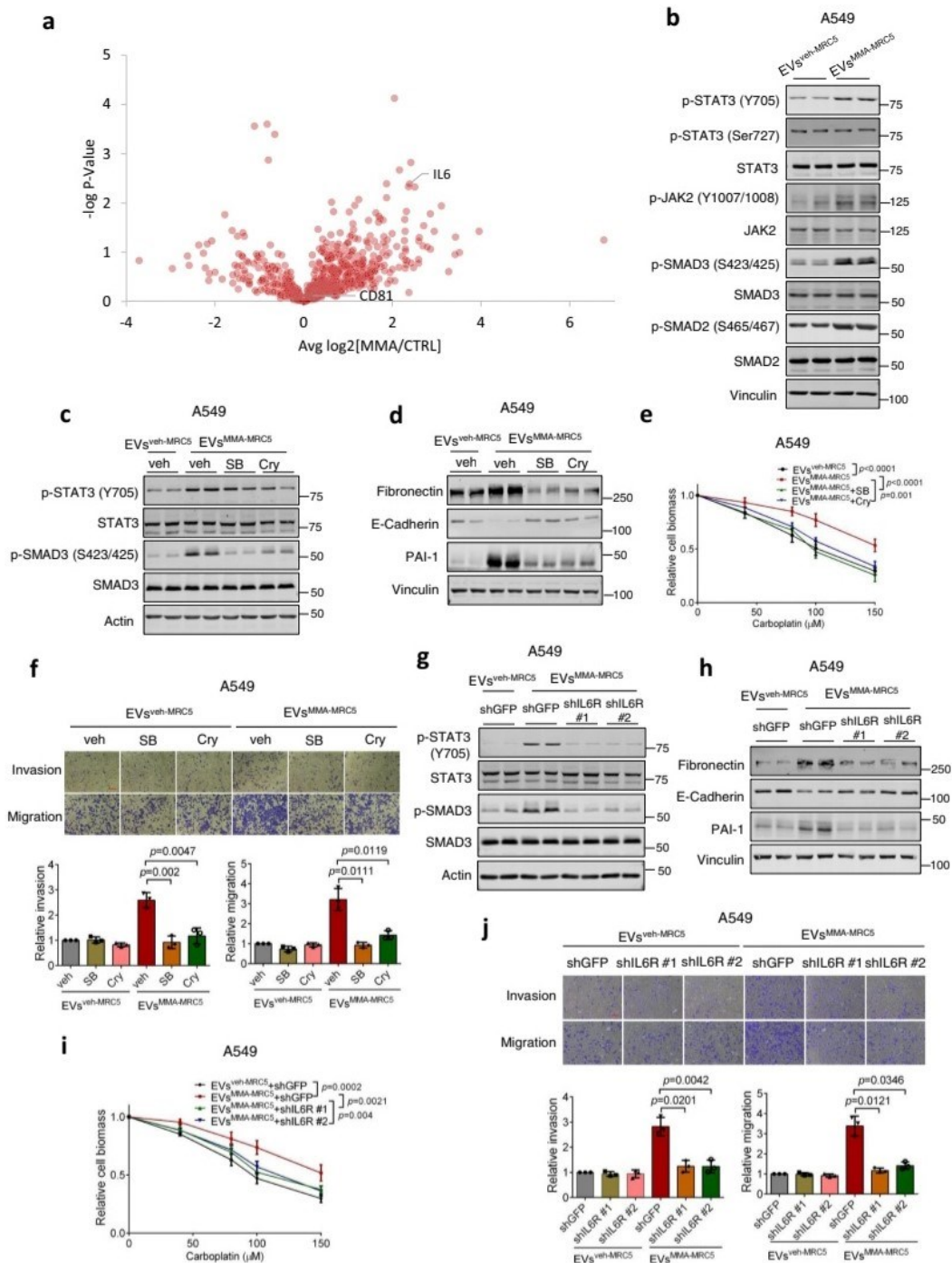
Next, we set out to characterize the mechanism by which MMA treatment of fibroblasts led to activation of the CAF phenotype and IL-6 loading into and secretion from EVs. We performed RNA-seq on MRC-5 fibroblasts treated with vehicle or MMA, and a pathway enrichment analysis of the RNA-seq data showed an upregulation of genes in the NF- $\kappa$ B and TGF $\beta$  signaling pathways in MMA-treated fibroblasts (Fig. 4a). Crosstalk between these two pathways has been described previously, wherein TGF $\beta$  signaling leads to the sequential phosphorylation of TAK1, IKK, and NF- $\kappa$ B (Fig. 4b)<sup>22</sup>. We confirmed that these pathways are activated in MRC-5 fibroblasts upon MMA treatment, or treatment by EVs derived from MMA-producing tumor cells (EVs<sup>shMUT-A549</sup>) (Figs. 4c, s6a). Using time course analysis, we noted that p65 phosphorylation occurred later than SMAD3 and TAK1 phosphorylation (Fig. 4c). Pharmacological inhibition of TGF $\beta$ R using SB43152, but not of TAK1 and IKK using Takinib and IKK16, respectively, effectively suppressed the induction of CAF markers by MMA, suggesting that the MMA-induced CAF phenotype is largely regulated by TGF $\beta$  separately from NF- $\kappa$ B signaling (Fig. 4d, e). Similarly, genetic knockdown of *TGFBRI*, but not *CHUK1* (encoding for IKK1), negated the ability of MMA to induce CAF markers (Fig. s6b, c). Interestingly, pharmacological inhibition of TGF $\beta$ R, TAK1 and IKK were all individually able to reduce IL-6 loading into EVs<sup>MMA-MRC5</sup>, indicating that

MMA-induced IL-6 secretion through EVs is mediated by NF- $\kappa$ B downstream of TGF $\beta$ -TAK1-IKK activation, and we saw the same effect with genetic knockdown of *TGFBRI* and *CHUK1* (Figs. 4f, s6d, e). In line with this and our earlier findings demonstrating the necessity of IL-6, all three inhibitors abrogated the ability of EVs<sup>MMA-MRC5</sup> to induce IL-6/JAK/STAT3 and TGF $\beta$  signaling in A549 tumor cells, along with EMT (Fig. 4g, h, Fig. s6f, g). In addition, all three inhibitors were able to suppress the ability of EVs<sup>MMA-MRC5</sup> to increase drug resistance in tumor cells, although this effect was small using SB43152 or TAKinib (Fig. 4i).

Notably, IKK inhibition had a greater effect than both TGF $\beta$ R inhibition or TAK1 inhibition in reducing IL-6 loading into EVs<sup>MMA-MRC5</sup>, which also corresponded with a greater effect in suppressing the potency of EVs<sup>MMA-MRC5</sup> for promoting EMT and drug resistance in A549 tumor cells (Fig. 4f–i). This suggested that the NF- $\kappa$ B activation downstream of TGF $\beta$ R signaling was supplemented by a certain level of NF- $\kappa$ B activation independent of TGF $\beta$ R signaling, together producing the full effect of IL-6 loading into EVs<sup>MMA-MRC5</sup> and the full potency of EVs<sup>MMA-MRC5</sup> to induce EMT and increase drug resistance in tumor cells.

As increased generation of reactive oxygen species (ROS) has been established to trigger both NF- $\kappa$ B and TGF $\beta$  signaling<sup>23,24</sup>, we conjectured that ROS activation of NF- $\kappa$ B both independently and through TGF $\beta$ R-TAK1-IKK-NF- $\kappa$ B signaling may be at the apex of the MMA signal that induces the CAF phenotype and function. In addition, pathway enrichment analysis of RNA-seq data showed that the oxidative stress response was upregulated in MMA-treated MRC-5 fibroblasts (Fig. 4a). Indeed, MMA treatment, as well as treatment by EVs from MMA-producing tumor cells (EVs<sup>shMUT-A549</sup>) increased ROS with peak levels at 6 h, corresponding to the peak in TGF $\beta$  and NF- $\kappa$ B signaling, while also increasing malondialdehyde (MDA), a marker of oxidative stress, over several days (Fig. 4c, Fig. 5a, Fig. s7a–c). While ROS induction by MMA was similar to that observed by other ROS inducers, including rotenone, TTFA, and hydrogen peroxide, these other inducers were unable to drive the same level of CAF activation in the fibroblasts (Fig. s7d, e). This suggests that MMA may increase ROS through a specific mechanism, or that MMA activates other processes that work with ROS to induce activation of fibroblasts.

Treatment of these fibroblasts with the antioxidants N-acetylcysteine (NAC) or SkQ1 effectively inhibited MMA induction of NF- $\kappa$ B and TGF $\beta$  signaling, along with the MMA-induced increase in CAF markers and increased IL-6 loading into EVs<sup>MMA-MRC5</sup> (Fig. 5b–e). When EVs<sup>MMA-MRC5</sup> were collected from fibroblasts that were co-treated with antioxidants, they were no longer able to activate IL-6/JAK/STAT3 or TGF $\beta$  signaling in A549 tumor cells (Fig. 5f). Consistently, antioxidant treatment of fibroblasts suppressed the ability of EVs<sup>MMA-MRC5</sup> to induce the EMT phenotype and increase drug resistance in A549 tumor cells, and reversed the ability of these tumor cells to form metastases in vivo (Fig. 5g–i). Together, our data illustrates a mechanism wherein exposure of fibroblasts to MMA generates ROS and induces oxidative stress, which activates NF- $\kappa$ B and TGF $\beta$  signaling. Canonical TGF $\beta$  signaling regulates CAF marker expression, while NF- $\kappa$ B signaling, which is activated by ROS both independently of and downstream of TGF $\beta$  signaling through TAK1 and IKK, regulates IL-6 association and secretion with vesicles. In tumor cells, IL-6 enriched EVs<sup>MMA-MRC5</sup> activates



IL-6/JAK/STAT3 and TGFβ signaling, promoting EMT and the acquisition of pro-aggressive traits (Fig. 6).

**Discussion**

Here, we depict how a recently identified aging-associated and tumor-produced oncometabolite, MMA, can also function as a tumor cell messenger by acting on the TME to drive metastatic progression. We also characterize the downstream signaling cascades activated by

MMA in fibroblasts. By increasing ROS generation, MMA induces a secretory signature in CAFs wherein IL-6 delivered in EVs drives metastatic signaling and progression of epithelial-like (or primary) cancer cells.

While the structure of the signaling cascades activated by MMA are likely to vary according to cell-type, the ability of MMA to induce oxidative stress may be a conserved phenomenon upstream of MMA-mediated functions in other cellular contexts, such as the TGFβ

**Fig. 3 | IL-6 in the EVs of MMA-treated fibroblasts mediates pro-aggressive STAT-3 and TGF $\beta$  signaling in tumor cells.** **a** Volcano plots showing protein level distribution from proteomics analysis comparing the compositions of EVs isolated from vehicle- or MMA-treated MRC-5 fibroblasts ( $n = 3$  independent experiments, two-sided paired  $t$ -test). **b** Immunoblots showing JAK2-STAT3 signaling and TGF $\beta$  signaling after 3 h of EV treatment in A549 cells. **c** Immunoblots measuring signal activation in A549 cells pre-treated with vehicle, TGF $\beta$ R inhibitor SB431542 or JAK inhibitor cryptotanshinone for 30 min, then treated with EVs from MRC-5 fibroblasts for 3 h. **d–f** Pro-aggressive properties of A549 cells treated with EVs<sup>veh-MRC5</sup> or EVs<sup>MMA-MRC5</sup> with or without the TGF $\beta$ R inhibitor SB431542 or the JAK inhibitor cryptotanshinone for 4 days, evaluated by immunoblots measuring EMT marker

expression (**d**), carboplatin resistance assay (**e**;  $n = 3$  independent experiments, mean  $\pm$  SEM, two-way ANOVA), and invasion and migration transwell assays (**f**; red scale bar indicates 100 $\mu$ m,  $n = 3$  independent experiments, mean  $\pm$  SEM, two-sided paired  $t$ -test). **g** Immunoblots measuring signal activation in A549 cells with shGFP or *shIL-6R* knockdown (#1 and #2) and treated with EVs<sup>veh-MRC5</sup> or EVs<sup>MMA-MRC5</sup> for 3 h. **h–j** Pro-aggressive properties of A549 cells treated with EVs<sup>veh-MRC5</sup> or EVs<sup>MMA-MRC5</sup> with shGFP or *shIL-6R* knockdown for 5 days, evaluated by immunoblots measuring EMT marker expression (**h**), carboplatin resistance assay (**i**;  $n = 3$  independent experiments, mean  $\pm$  SEM, two-way ANOVA), and invasion and migration transwell assays (**j**; red scale bar indicates 100 $\mu$ m,  $n = 3$  independent experiments, mean  $\pm$  SEM, two-sided paired  $t$ -test).

signaling-dependent increase in SOX4 in MMA-treated tumor cells<sup>15</sup>. More research is warranted to verify this possibility, as well as to elucidate how MMA may increase ROS. A potential mechanism may involve MMA's ability to inhibit succinate dehydrogenase, an essential component of the mitochondrial respiratory chain complex II<sup>25</sup>. Indeed, diseased mitochondria and mitophagy dysfunction has been described in *MUT* deficiency underlying methylmalonic acidemia<sup>26</sup>. Additionally, while previous studies have described a role of ROS in CAF activation, the precise mechanisms by which ROS contributes to this process across various contexts are still unclear<sup>27,28</sup>. For example, ROS induction may be preceded by an upstream event, such as loss of CAV-1, and co-occur with mitochondrial dysfunction and aerobic glycolysis to stimulate CAF activation<sup>27</sup>. In our cellular system, we observed that other known ROS inducers, including rotenone and hydrogen peroxide, were unable to produce CAF marker activation to the same level as MMA. These findings suggest that while ROS is essential for MMA-induced CAF activation, other simultaneous processes, that are potentially also downstream of MMA, are required.

The role of circulatory IL-6 in metastasis and therapy resistance has been previously observed, and is long known to be increased in the serum with age<sup>29,30</sup>. IL-6 was also recently reported to be increased in the serum of methylmalonic acidemia patients<sup>31</sup>. The discovery of a specific mode of IL-6 delivery from stroma to tumor through EVs, however, likely confers a particularly calibrated and potent effect. The proportion of IL-6 released freely or delivered through EVs has been shown to vary widely and depend on the biological systems involved; for example, almost all IL-6 released from monocytes are free, while all IL-6 released from T cells are encapsulated<sup>32</sup>. In addition to providing a concentrated influx of the cytokine when IL-6 is delivered through these lipidic structures, EVs also protect their contents from environmental degradation, and expression of surface proteins may facilitate the targeting of EVs to distinct cell types<sup>32</sup>. Co-delivery of different cytokines encapsulated together is also likely to have different synergistic effects driving distinct phenotypes. A precise characterization of the regulatory mechanisms dictating how IL-6 is loaded into EVs and the proportions of IL-6 encapsulated or embedded in the membranes will require further investigation, and will likely illuminate key pathways for cytokine delivery through EVs in other cellular contexts.

As IL-6 signaling is pro-inflammatory and TGF- $\beta$  signaling is anti-inflammatory, their associated pathways are often described to function antagonistically. For example, STAT3 can bind Smad3 and disrupt formation of Smad2/Smad3 complexes, hindering the DNA-binding ability of these transcription factors<sup>33</sup>. In contrast, we show that STAT3 signaling in tumor cells treated with EVs<sup>MMA-MRC5</sup> promotes TGF- $\beta$  signaling in a positive crosstalk interaction to drive EMT. This is supported by previous studies which found that STAT3-Smad3 complex formation and nuclear translocation is required for TGF- $\beta$ -induced *Snail* promoter activation and EMT induction in *KRAS* mutated Panc-1 cells<sup>34</sup>. The factors that determine the nature of these interactions in different contexts remain to be elucidated and may be defined by the varying strengths of each pathway's activation or by the expression of additional co-factors.

Furthermore, while this was not explored in the current study, our findings support a likely means by which the aging body shapes the TME through MMA, further coloring in the link between age as a risk factor and poorer cancer outcomes. Indeed, it has been shown that older people have increased tissue fibrosis, and the possibility that MMA may play a role in this is certainly intriguing<sup>35</sup>. Beyond the effect of MMA on fibroblasts, the full scope of how MMA functions on other cell components of the TME, such as the immune system, has yet to be uncovered, and represents a huge untapped potential for therapeutic interventions targeting various stages of the tumorigenic process.

## Materials and methods

### Ethics statement

All experiments performed in this study are in compliance with local ethical regulations. All animal experiments were approved by the Institutional Animal Care & Use Committee (IACUC) at the Belfer Research Building Vivarium of Weill Cornell Medicine.

### Analysis of additional validation datasets

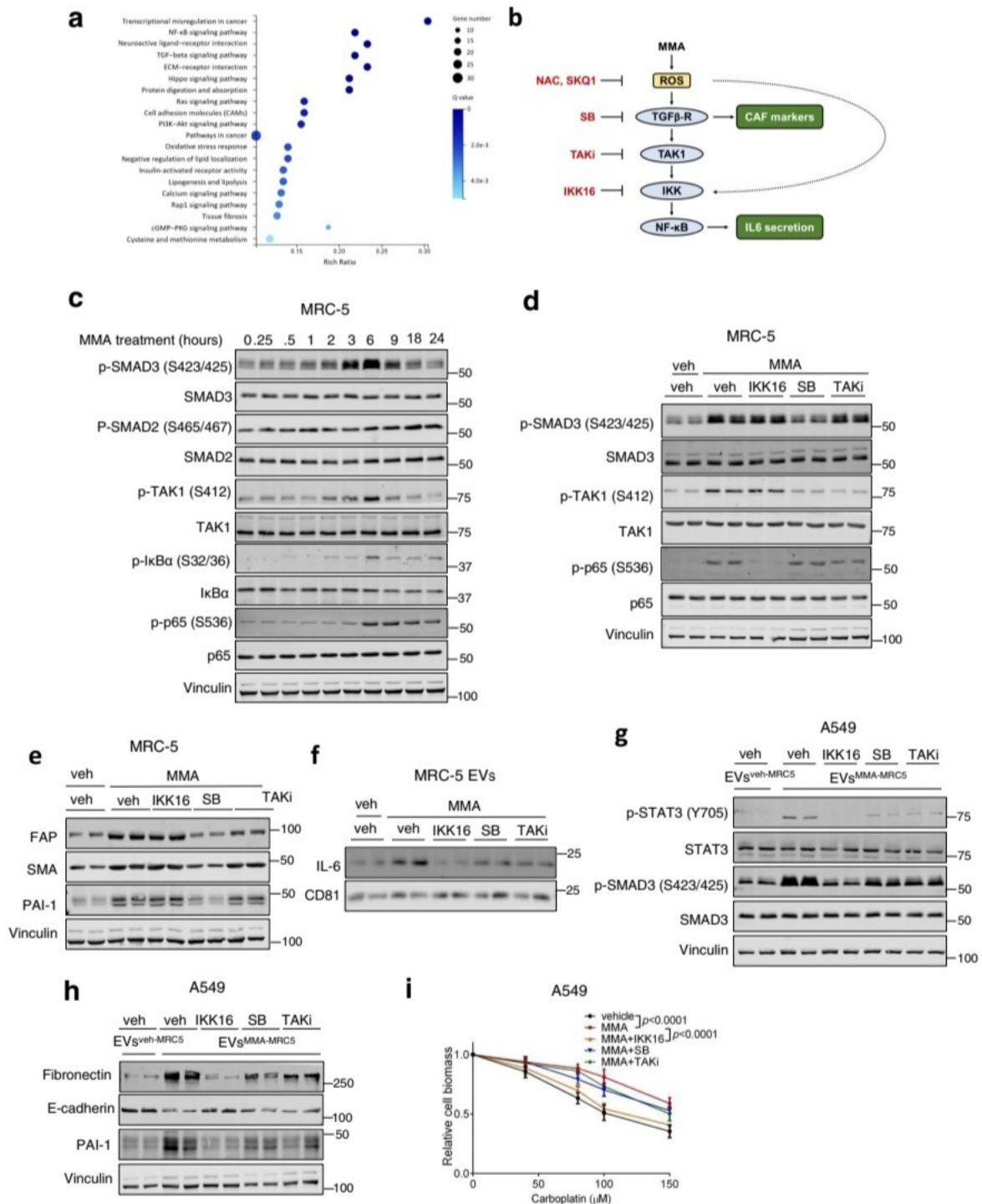
The filtered, processed, and annotated single-cell RNA-seq data from an independent lung adenocarcinoma patient cohort<sup>36</sup> was received directly from its authors. This dataset includes 17 patient samples – 5 metastatic, 8 primary tumor, and 4 normal samples. Analysis was limited to annotated tumor cells from 8 primary tumors and 4 tumor metastases; genes not expressed in any of the tumor cells were removed. The one spinal metastasis was excluded because it exhibited stark patient-specific effects within tumor cells that were not reproduced across other samples. This yielded a filtered count matrix containing 2537 tumor cells and 18,947 genes. All analyses were performed using the normalized or normalized-and-imputed count matrices provided by the authors.

### Cell lines

A549 cells (non-small cell lung cancer; CCL-185) were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) and cultured in RPMI 1640 medium (Corning) supplemented with 10% FBS (Sigma-Aldrich) and 1% penicillin-streptomycin (Gibco). A375 human melanoma cells (CRL-1619) were also obtained from ATCC and cultured in high-glucose DMEM (Gibco) supplemented with 10% FBS (Sigma-Aldrich) and 1% penicillin-streptomycin (Gibco). MRC-5 human lung fibroblasts (CCL-171) and BJ foreskin fibroblasts (CRL-2522) were also obtained from ATCC and maintained in EMEM (ATCC) supplemented with 10% FBS (Sigma-Aldrich) and 1% penicillin-streptomycin (Gibco). HEK293T cells were obtained from GenHunter and cultured in high-glucose DMEM (Gibco) supplemented with 10% FBS (Sigma-Aldrich) and 1% penicillin-streptomycin (Gibco). All cell lines were maintained at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. All cell lines were routinely tested for mycoplasma and were at all times mycoplasma negative.

### Mice

Female nu/nu athymic mice (Envigo) were purchased at the age of 6–7 weeks, and the experiments were started 7–10 days after the mice were received at the Weill Cornell Medicine Belfer Research Building



Vivarium. Experimental groups of up to 10 mice were created randomly and mice were group housed (maximum five in a cage) in standard cages with unrestricted acidified water and food (PicoLab Rodent Diet 5053 (Labdiet, Purina) containing 20% protein and 5% fat). Animal husbandry was carried out by the vivarium technical staff in a human xenograft designated area following animal biosafety level-2 procedures. The room was maintained at 21–23 °C with a 12 h

light–dark cycle. The mice were maintained in compliance with Weill Cornell Medicine Institutional Animal Care and Use Committee protocols. The tumor size limit on the protocol was 20 mm on the largest dimension or 2.5 cm<sup>3</sup> tumor volume or 10% of body weight, whichever was reached first. For mouse studies, no statistical method was used to predetermine sample size, mice were randomly distributed among the treatment groups and no blinding was performed. All mouse studies

**Fig. 4 | MMA promotion of the CAF phenotype and EV-associated IL6 secretion occurs through TGF- $\beta$  and NF- $\kappa$ B signaling.** **a** Pathway enrichment analysis on RNA-seq data from MRC-5 cells treated with vehicle or MMA for 5 days. Genes with expression differences greater than two-fold and  $p < 0.001$  were counted ( $n = 3$  independent experiments, two-sided paired  $t$ -test). **b** TGF $\beta$  signaling leads to downstream NF- $\kappa$ B activation. **c** Immunoblots measuring signal activation over time in MRC-5 fibroblasts treated with 1 mM MMA. **d** Immunoblots measuring signaling activation in MRC-5 fibroblasts treated with MMA alone or in combination with IKK inhibitor IKK16, TGF $\beta$ R inhibitor SB431542, or TAK1 inhibitor TAKinib for 6 h. **e** Immunoblots of CAF markers in MRC-5 lysates treated with MMA in combination with IKK inhibitor IKK16, TGF $\beta$ R inhibitor SB431542, or TAK1 inhibitor

TAKinib for 5 days. **f** Immunoblots showing IL-6 amount in EVs from MRC-5 fibroblasts treated with vehicle or MMA or MMA alone or in combination with IKK inhibitor IKK16, TGF $\beta$ R inhibitor SB431542, or TAK1 inhibitor TAKinib. **g** Immunoblots measuring signaling activation in A549 cells treated with EVs from MRC-5 fibroblasts treated with MMA alone or in combination with IKK inhibitor IKK16, TGF $\beta$ R inhibitor SB431542, or TAK1 inhibitor TAKinib for 3 h. **h**, **i** Pro-aggressive properties of A549 cells treated with EVs from MRC-5 fibroblasts treated with vehicle, MMA alone, or MMA in combination with IKK inhibitor IKK16, TGF $\beta$ R inhibitor SB431542, or TAK1 inhibitor TAKinib, evaluated by immunoblots measuring EMT marker expression (**h**) and carboplatin resistance assay (**i**);  $n = 3$  independent experiments, mean  $\pm$  SEM, two-way ANOVA).

have received ethical approval by IACUC at Weill Cornell Medicine under protocol number 2014-0060.

### Immunohistochemistry staining

Immunohistochemistry (IHC) was performed on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. Five-micron paraffin sections were cut. After antigen retrieval with citrate solution, slides were rinsed and blocked with a peroxidase-blocking reagent and incubated with  $\alpha$ SMA antibody (ab150301- Abcam, 1:200). Slides were scanned using the Zeiss AxioScan7. Five views per mouse and eight mice per group were used for the quantification. The signal intensity of each view was quantified by using Image J. All the values were normalized to the average signal of shGFP group.

### Conditioned media collection and extracellular vesicle isolation

Fibroblasts were treated with MMA for 5 days. Then, the media was removed, cells were washed twice with PBS, and serum free medium was added. Two days later, the CM was collected. CM was centrifuged at 2000  $g$  for 15 min, then 120,000  $g$  for 20 min. The supernatant was then ultracentrifuged at 100,000  $g$  for 70 min. Then, the supernatant was discarded, and the pellet was washed by resuspension in PBS and re-ultracentrifugation at 100,000  $g$  for 70 min. The total protein amount in EVs was determined using the DC Protein Assay Kit II (BioRad). Particle numbers were determined using the Nanosight NSS00.

### Electron microscopy

EVs were processed for EM imaging as previously described<sup>37</sup>. Frozen EVs were thawed and fixed on ice for 5 min in 2% PFA (EMS, 15710). Then, the sample was deposited on Formvar/carbon-coated nickel grids (EMS, FCF400H-Ni-SB), fixed for 5 min in 1% glutaraldehyde (EMS, 16120), contrasted for 5 min with 4% uranyl oxalate and finally embedded in 2% methyl cellulose (Sigma, M6385) and uranyl acetate solution (EMS 22400). Images were acquired using a JEOL JEM 1400 transmission electron microscope (JEOL, USA, Inc, Peabody, MA) at 100 keV equipped with a Veleta 2K x 2K CCD (EMSIS, GmbH, Muenster, Germany). For each experiment, two grids were prepared for each sample, and 5 random images were acquired from 5 random hexagons in each grid. The largest diameters of all membrane particles were quantitated using ImageJ.

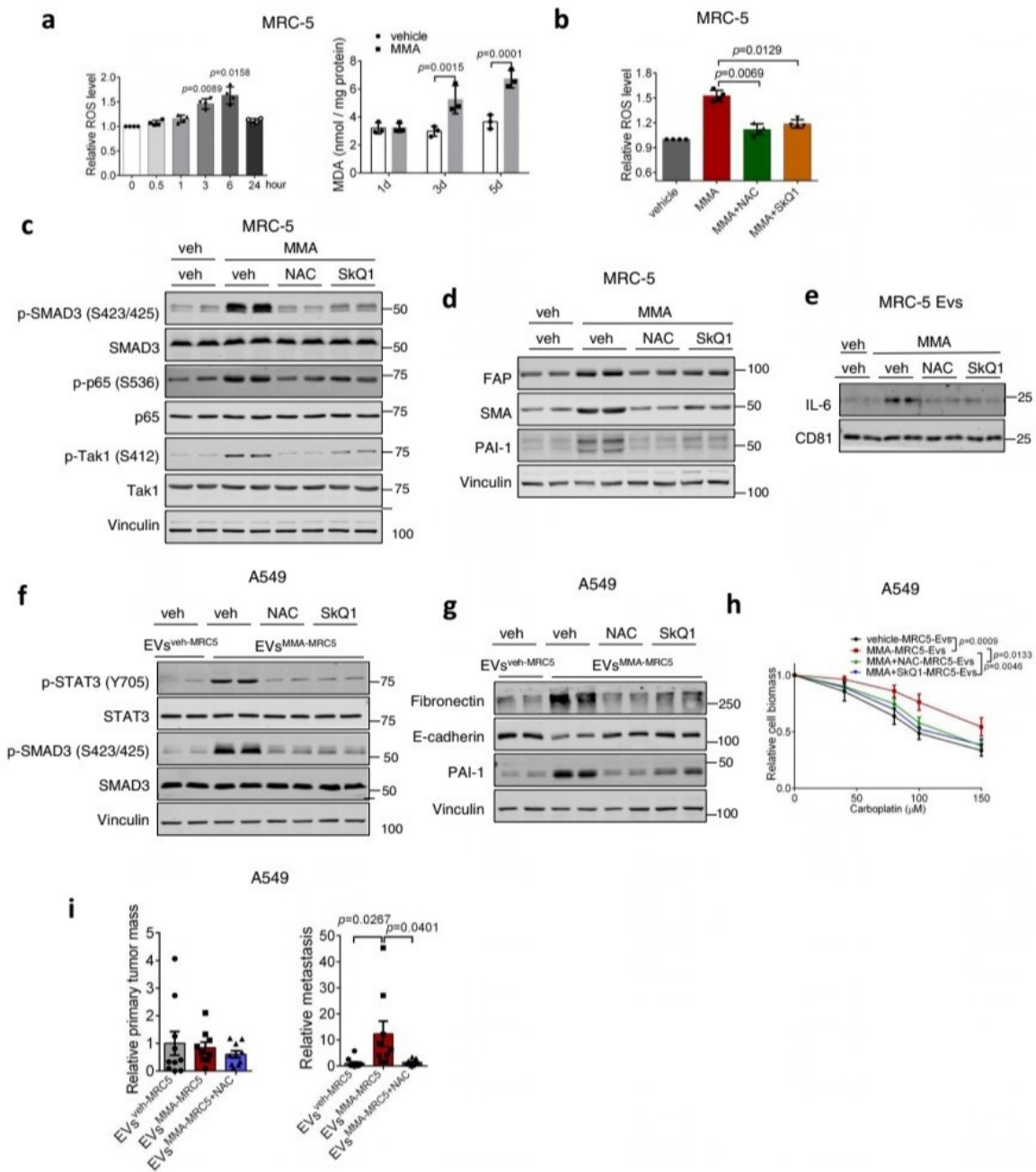
### Co-culture experiments

Cells to be collected for immunoblotting were seeded in 2 ml RPMI media with 10% FBS onto six-well plates. The next day, accompanying co-culture cells were seeded in another 2 ml of RPMI media with 10% FBS onto the top of 0.4  $\mu$ m cell culture inserts (VWR) placed into the previously seeded six-well plates. The plates were gently shaken four times a day for 3 days. Inserts were discarded and proteins were extracted as described in the *Immunoblots* section.

### Immunoblots

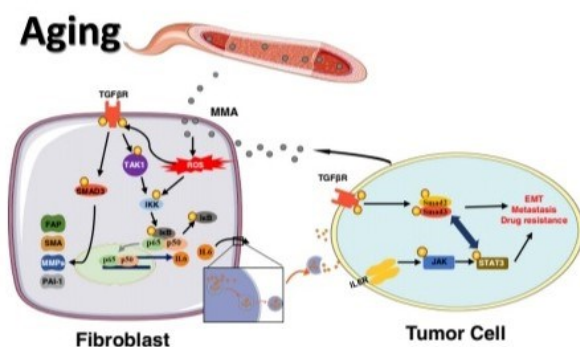
Proteins were isolated directly from intact cells via acid extraction using a 10% TCA solution (10% trichloroacetic acid, 25 mM NH<sub>4</sub>OAc,

1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8.0). Precipitated proteins were harvested and solubilized in a 0.1 M Tris-HCl pH 11 solution containing 3% SDS and boiled for 10–15 min. For EV proteins, samples were extracted using RIPA buffer (40 mM HEPES [pH 7.4], 1 mM EDTA, 120 mM NaCl, 0.5 mM DTT, 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 0.1% Brij-35, 0.1% deoxycholate, and 0.5% NP-40) supplemented with protease inhibitors (250 mM PMSF, 5 mg/ml pepstatin A, 10 mg/ml leupeptin, and 5 mg/ml aprotinin), incubated at 4 °C for 15 min, then incubated with 4 $\times$  LDS for 10 min at 70 °C. Protein content was determined with the DC Protein Assay kit II (BioRad), and 30  $\mu$ g total protein from each sample was run on SDS-PAGE under reducing conditions. The separated proteins were electrophoretically transferred to a nitrocellulose membrane (GE Healthcare), which was blocked in TBS-based Odyssey Blocking buffer (LI-COR). Proteins of interest were probed with specific antibodies (listed as ‘target protein’ (catalog no. - vendor, dilution factor): FAP (66562 s-Cell Signaling Technology, 1:1000), SMA (ab5694-Abcam, 1:1000), CAV-1(ab2910-Abcam, 1:1000), PAI-1 (612024-BD, 1:1000), PCCA (ab187686-Abcam, 1:2000), Vinculin (V9264-Sigma Aldrich, 1:5000), MMP-2 (4022 S-Cell Signaling Technology 1:1000), MMP-14 (ab51074-Abcam, 1:1000), MMP-13 (ab39012-Abcam, 1:1000), CTGF (ab6992-Abcam, 1:500), E-Cadherin (610181-BD, 1:1000), Fibronectin (ab2413-Abcam, 1:10,000), Vimentin (5741 S-Cell Signaling Technology, 1:2000), Snail (3879 S-Cell Signaling Technology, 1:1000), p-JAK2(Y1007/1008) (3771-Cell Signaling Technology, 1:500), JAK2 (3230-Cell Signaling Technology, 1:1000), p-Stat3 Y705 (ab76315-Abcam, 1:1000), p-Stat3 S727 (9136 S-Cell Signaling Technology, 1:1000), Stat3 (9139 S-Cell Signaling Technology, 1:1000), p-Smad3 S423/425 (ab52903-Abcam, 1:1000), Smad3 (9523 S-Cell Signaling Technology, 1:1000), IL-6 (12153 S-Cell Signaling Technology, 1:1000), CD81 (56039 S-Cell Signaling Technology, 1:1000), CD9 (ab223052-Abcam, 1:500), Flotillin-1 (610820-BD, 1:1000), GM130 (610823-BD, 1:1000), Lamin (4777-Cell Signaling Technology, 1:1000), Calnexin (ab112995-Abcam, 1:1000),  $\beta$ -Actin (4967-Cell Signaling Technology, 1:2000), p-Smad2 S465/467 (3108 S-Cell Signaling Technology, 1:1000), Smad2 (3103 S, Cell Signaling Technology, 1:1000), p65 (8242 S-Cell Signaling Technology, 1:1000), p-p65 S536 (3036 S-Cell Signaling Technology, 1:1000), p-Ik $\beta$  (Ser32/36) (9246 S-Cell Signaling Technology, 1:1000), Ik $\beta$  (9242 S-Cell Signaling Technology, 1:1000), TAK1 (5206 S-Cell Signaling Technology, 1:1000), p-TAK1 S412 (9339 S-Cell Signaling Technology, 1:1000). Membranes were incubated with primary antibodies overnight at 4 °C. Membranes were then either incubated with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit (NA934-GE Healthcare, 1:10,000), anti-mouse (NA931-GE Healthcare, 1:10,000) or anti-goat (AP180P-Millipore, 1:10,000) immunoglobulin for 1 h at room temperature, and signals developed using Amersham ECL detection system (GE Healthcare), or they were incubated with the appropriate donkey anti-rabbit Alexa Fluor 488 (A-21206-Thermo Fisher Scientific, 1:10,000) or donkey anti-mouse Alexa Fluor 555 (A31570-Thermo Fisher Scientific, 1:10,000) immunoglobulin for 1 h at room temperature, and signals were developed using the LI-COR Odyssey CLx Imaging System.



**Fig. 5 | TGF- $\beta$  and NF- $\kappa$ B mediated activation of fibroblasts and EV-associated IL6 secretion occurs downstream of ROS generation. **a** (left) ROS levels and (right) MDA levels in MRC-5 fibroblasts after 1 mM MMA treatment ( $n = 4$  independent experiments for ROS measurement, mean  $\pm$  SEM, one-way ANOVA;  $n = 3$  independent experiments for MDA measurement, two-sided paired  $t$ -test). **b** ROS levels in MRC-5 fibroblasts after MMA treatment alone or in combination with NAC or SkQ1 ( $n = 4$  independent experiments, mean  $\pm$  SEM, two-sided paired  $t$ -test). **c, d** Immunoblots of MRC-5 fibroblasts treated with MMA alone or in combination with NAC or SkQ1 for 6 h (**c**) or 5 days (**d**). **e** Immunoblots showing IL-6 amount in EVs from MRC-5 fibroblasts after MMA treatment alone or in combination with NAC or SkQ1. **f** Immunoblots measuring signaling activation in A549 cells treated for 3 h**

with EVs<sup>veh-MRC5</sup> or EVs<sup>MMA-MRC5</sup> from MRC-5 fibroblasts treated with MMA alone or in combination with NAC or SkQ1. **g, h** Pro-aggressive traits of A549 cells treated for 5 days with EVs<sup>veh-MRC5</sup> or EVs<sup>MMA-MRC5</sup> from MRC-5 fibroblasts treated with MMA alone or in combination with NAC or SkQ1, evaluated by immunoblots measuring EMT marker expression (**g**) and carboplatin resistance assay (**h**);  $n = 3$  independent experiments, mean  $\pm$  SEM, two-way ANOVA). **i** Primary tumor and metastasis formation in mice 4 weeks after subcutaneous injection of A549 cells treated with EVs from MRC-5 fibroblasts treated with vehicle, MMA, or MMA and NAC ( $n = 10$  mice for EVs<sup>veh-MRC5</sup> and EVs<sup>MMA-MRC5+NAC</sup> groups,  $n = 9$  mice for EVs<sup>MMA-MRC5</sup> group, mean  $\pm$  SEM, two-sided unpaired  $t$ -test). Data are partially previously represented in Fig. 2g.



**Fig. 6 | MMA activates fibroblasts and induces their EV-associated IL-6 secretion, which drives metastatic reprogramming in tumor cells.** MMA produced by tumor cells induces generation of ROS in fibroblasts. ROS activates TGF $\beta$  signaling, which promotes expression of CAF markers, and NF- $\kappa$ B signaling, which promotes IL-6 loading into and secretion through EVs. EVs loaded with IL-6 activate STAT3 signaling and TGF $\beta$  signaling in tumor cells, promoting EMT, drug resistance and metastasis.

### Cell culture treatments

For all time courses signaling experiments, cells were seeded one day before inhibitor and MMA treatments. Inhibitors were added 30 min before any MMA treatments. Cells were treated at the same time, then protein was harvested at different time points. Inhibitors and antioxidants used were as follows: SB431542 (Selleck Chemicals, 5  $\mu$ M), Cryptotanshinone (Cayman Chemical, 1  $\mu$ M), IKK16 (Millipore Sigma, 1  $\mu$ M), Takinib (Cayman Chemical, 10  $\mu$ M), SkQ1 (Cayman Chemical, 1  $\mu$ M), NAC (Sigma Aldrich, 2 mM).

For long-term EV treatments of tumor cells (such as for EMT marker measurement and functional assays such as drug resistance, colony formation and in vivo experiments), cells were seeded and then treated with 5  $\mu$ g/ml of EVs for 3–5 days. For short-term EV treatments of tumor cells (such as for signaling activation measurement), cells were treated with 5  $\mu$ g/ml of EVs for 3 h.

### Proteomics analysis of extracellular vesicles

EVs were isolated from the conditioned medium of vehicle- or MMA-treated MRC5 fibroblast and total protein amount in EVs was measured as described above. 50  $\mu$ g of total protein from each sample was TCA precipitated and acetone washed. Pellets were re-suspended in 8 M urea, 50 mM ammonium bicarbonate (AMBIC). Proteins were reduced and alkylated with dithiothreitol and iodoacetamide. Samples were diluted to 2 M urea with 50 mM AMBIC and digested overnight with Lysyl endopeptidase (lysC, Wako Chemicals USA, Inc.), then diluted to 1 M urea and digested with trypsin (Promega V5111) for 6 h. Peptides were desalted on C18 STAGE Tips<sup>38</sup>. Eluted peptides were dried and re-suspended in 5% formic acid.

Mass Spectrometric analysis was performed on a Thermo Orbitrap Fusion mass spectrometer equipped with a FAIMS Pro ion mobility cell and an Easy nLC-1000 UHPLC. Peptides were separated with a gradient of 5–26% ACN in 0.1% FA over 75 min and introduced into the mass spectrometer by electrospray ionization as they eluted off a self-packed 40 cm, 100  $\mu$ m (ID) column packed with 1.8  $\mu$ m, 120 Å pore size, C18 resin (Sepax Technologies, Newark, DE). The column was heated to 60 °C. Peptides were detected using a data-dependent method. For each precursor scan in the Orbitrap, we cycled through five FAIMS compensation voltage values (–40, –50, –60, –70, –80). For each, we allowed up to 1 s for selection of the most abundant precursors for HCD fragmentation (35% NCE) and MS/MS analysis in the ion trap. AGC targets of 4e5 and 1e4 were used for MS1 and MS2 scans, respectively. Ions selected for MS2 analysis were excluded from reanalysis for 45 s. Ions with +1 or unassigned charge were also excluded from analysis.

MS/MS spectra were matched to peptide sequences using COMET (version 2019.01 rev. 5)<sup>39</sup> and a composite database containing the 20,415 Uniprot reviewed canonical predicted human protein sequences (<http://uniprot.org>, downloaded 5/1/2019) and its reversed complement. Search parameters allowed for two missed cleavages, a mass tolerance of 25 ppm, a static modification of 57.02146 Da (carboxyamidomethylation) on cysteine, and a dynamic modification of 15.99491 Da (oxidation) on methionine. Peptide spectral matches were filtered to 1% FDR using the target-decoy strategy<sup>40</sup> and then to 1% protein FDR. Label-free quantification was performed using peptide intensities from the integrated areas under each corresponding extracted-ion-chromatogram peak. Intensities for all peptides mapping to each protein were summed for each sample. Subsequent data processing, including normalization and statistical analysis, was done using Perseus as described<sup>41</sup>.

### Colony formation assays

The base layer of agarose gel plates was made by mixing 1.2% agarose gel solution warmed up at 42 °C with 2 $\times$  medium with 20% FBS in a 1:1 ratio and allowed to set at room temperature. To form the top layer, 0.6% agar and 2 $\times$  medium with 20% FBS were warmed at 42 °C. Cells were resuspended in this 1:1 mixture (giving 0.3% agar in 1 $\times$  medium) and allowed to set for 4 h at room temperature. Cells were treated with EVs and media was changed twice a week. After 3–4 weeks, cells were stained using 0.1% crystal violet in 10% ethanol for 10 min, followed by 5 $\times$  rinses in dH<sub>2</sub>O. Plates were first scanned and colonies were counted using Image J.

### Drug resistance assays

A549 and A375 tumor cells were treated with EVs for 5 days. Cells were then seeded into 96-well plates in technical triplicates. The next day, the cells were treated with vehicle control (DMSO (0.1%), carboplatin (Cayman Chemical, 0–150  $\mu$ M), paclitaxel (Cayman Chemical, 0–20 nM), vemurafenib (Selleck Chemicals 0–800 nM), AZD6244 (Selleck Chemicals, 0–200 nM) at various concentrations. Cells were incubated for 3 days and then fixed in 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences) diluted in PBS for 30 min. After the fixative solution was removed, the plates were washed with PBS and stained with 0.1% crystal violet solution for 15 min. The staining solution was removed and the plates were washed five times and allowed to dry at room temperature. Crystal violet staining was eluted using 10% glacial acetic acid and the absorbance at 590 nm was measured using an Envision plate reader (Perkin Elmer).

### Transwell invasion and migration assays

A549 and A375 tumor cells were treated with EVs for 5 days. After trypsinization, cells were counted and resuspended in serum free media supplemented with 250  $\mu$ g/ml BSA (Sigma-Aldrich) (assay media) at a concentration of 2  $\times$  10<sup>5</sup> cells/ml. 650  $\mu$ l of media with 10% FBS was used as the chemoattractant and added to the bottom chamber of cell culture inserts, and 250  $\mu$ l of cells in assay media was added to the top chamber of cell culture inserts. For migration assays, Boyden chamber inserts (BD Biosciences, 8  $\mu$ m pore size) were used, and for invasion assays, BD BioCoat invasion chambers coated with growth factor reduced Matrigel were used. Invasion chambers were prepared according to manufacturer instructions. Cells were allowed to migrate and invade for 24 h, then cells that had migrated to the lower surface of the membrane were fixed in ethanol and stained with 0.1% crystal violet. 10 $\times$  images of crystal-violet stained cells were captured using a Nikon DS-Fi2 camera, and quantifications were carried out in an automated fashion using Fiji/ImageJ v1.52. In brief, binary images of the area covered by crystal violet-positive cells was generated using thresholding and settings that were appropriate for control samples, and the same settings were used throughout the analysis. The percentage area covered by crystal

violet-positive cells was quantified for each condition, using a minimum of three technical replicates.

#### Oxidative stress assays

For short-term ROS quantification, fibroblasts were seeded in 12-well plates. After 12 h, MMA was added at indicated periods of time. Media was removed and cells were washed with PBS. Then, media containing 20  $\mu$ M of 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) (Cayman Chemical) was added to the cells and incubated for 45 min. Cells were then washed with PBS, trypsinized and added to an opaque black 96-well plate. Fluorescence signaling was quantified using an Envision plate reader (Perkin Elmer) and normalized to total cell number. For measurement of MDA, cells were prepared and quantified using the Thiobarbituric Acid Reactive Substances Assay Kit (Cayman Chemical) according to manufacturer instructions.

#### Metabolite extraction and mass-spec analysis

Tumor cells were seeded in 10 cm dishes and infected with shMUT virus for 3 days. Cells were washed with cold PBS and incubated with 5 ml FBS free DMEM to collect conditioned medium. 48 h later, the conditioned medium was collected and the tumor cells were counted. 4 volumes of 100% methanol were added to 1 volume of CM, then subjected to speed vacuum for about 4 h until the solution was fully evaporated. The pellets were resuspended in 10  $\mu$ L of 50% MeOH (in H<sub>2</sub>O). Then, the mixture was spun down, and 10  $\mu$ L of supernatant was mixed with 50  $\mu$ L short-chain fatty acids derivatization solution. The resulting mixture was vortexed and incubated at 60 °C for 1 h, then the mixture was centrifuged at 21,000  $\times$  g for 20 min, and the supernatant was analyzed using an Agilent 1290 LC system coupled to an Agilent 6530 quadrupole time-of-flight mass spectrometer with a 130 Å, 1.7  $\mu$ m, 2.1 mm  $\times$  100 mm ACQUITY UPLC BEH C18 column (Waters). We used the following solvent system: A: H<sub>2</sub>O with 0.1% formic acid; B: Methanol with 0.1% formic acid. 20  $\mu$ L of each sample was injected, and the flow rate was 0.35 mL/min with a column temperature of 40 °C. The gradient for HPLC-MS analysis was: 0–6.0 min, 99.5–70.0% A; 6.0–9.0 min, 70.0–2.0% A; 9.0–9.4 min, 2.0% A; 9.4–9.6 min, 2.0–99.5% A. Peaks were assigned by comparison with authentic standards. Relative metabolite amounts were normalized to cell number.

#### shRNA gene silencing

shMUT #1 (TRCN0000049038), shMUT #2 (TRCN0000049040), shIL6 #1 (TRCN0000059203), shIL6#2 (TRCN0000372668), shIL6R #1 (TRCN0000058779), shIL6R #2 (TRCN0000058780), shGFP (TRCN0000072181), shPCCA #1 (TRCN0000078424), shPCCA #2 (TRCN0000078423), shCHUK #1 (TRCN0000194782), shCHUK #2 (TRCN0000199496), shTGFBRI #1 (TRCN0000194693), shTGFBRI #2 (TRCN0000196293) (all from Sigma Aldrich) lentiviruses were produced by co-transfection of HEK293T cells with plasmids encoding psPAX2 (Addgene plasmid 12260) and pMD2.G (Addgene plasmid 12259) using X-tremeGene HP (Roche) in accordance with the manufacturer's protocol. Medium was changed 16 h post-transfection and the virus harvested over 72 h, filtered, and used to infect fibroblasts and tumor cells with 8  $\mu$ g/ml polybrene (Sigma-Aldrich). Selection of resistant colonies was initiated 24 h after selection using 2  $\mu$ g/ml of puromycin (Sigma-Aldrich).

#### qPCR

RNA was extracted from cells using the Ambion PureLink RNA Mini Kit (Life Technologies) according to manufacturer's instructions and treated with DNase I (Amplification grade, Sigma-Aldrich). cDNA was synthesized using the iSCRIPT cDNA synthesis kit (BioRad) and analyzed by qPCR using SYBR green master mix (Life Technologies) on a QuantStudio6 Real-Time PCR system with QuantStudio Real-Time PCR software v1.3 (Life Technologies). Exported data were further

processed in Excel for Office 365. Target gene expression was normalized to expression of *TBP* and *ACTB*. Primer sequences are as follows: *IL6* forward: ACTCACCTCTTCAGAACGAATTG, *IL6* reverse: CCATCTTTGGAAGTTCAGGTTG. *IL6R* forward: CCCCTCAGCAATGTTGTTTGT, *IL6R* reverse: CTCCGGGACTGCTAACTGG.

#### Global gene expression analysis (RNA-seq)

RNA was extracted from cells using the Ambion PureLink RNA Mini Kit (Life Technologies) according to manufacturer's instructions and treated with DNase I (Amplification grade, Sigma-Aldrich). Total RNA integrity was checked using a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). RNA concentrations were measured using the Nanodrop system (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA). Preparation of RNA sample library and RNA-seq were performed by the Genomics Core Laboratory at Weill Cornell Medicine. RNA was prepared using TruSeq Stranded mRNA Sample Library Preparation kit (Illumina, San Diego, CA), according to the manufacturer's instructions. The normalized cDNA libraries were pooled and sequenced on Illumina NovaSeq6000 sequencer with pair-end 50 cycles. The sequencing libraries sequenced with paired-end 50 bps on NovaSeq6000 sequencer. The raw sequencing reads in BCL format were processed through bcl2fastq 2.19 (Illumina) for FASTQ conversion and demultiplexing. After trimming the adaptors with Cutadapt (version1.18) (<https://cutadapt.readthedocs.io/en/v1.18/>), RNA reads were aligned and mapped to the GRCh38 human reference genome by STAR (Version2.5.2) (<https://github.com/alexdobin/STAR>)<sup>42</sup>, and transcriptome reconstruction was performed by Cufflinks (Version 2.1.1) (<http://cole-trapnell-lab.github.io/cufflinks/>). The abundance of transcripts was measured with Cufflinks in Fragments Per Kilobase of exon model per Million mapped reads (FPKM)<sup>43,44</sup>. Gene expression profiles were constructed for differential expression, cluster, and principle component analyses with the DESeq2 package (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.html>)<sup>45</sup>. For differential expression analysis, pairwise comparisons between two or more groups using parametric tests where read-counts follow a negative binomial distribution with a gene-specific dispersion parameter. Corrected *p* values were calculated based on the Benjamini-Hochberg method to adjusted for multiple testing.

#### Subcutaneous injections and metastasis formation assay in mice

Tumor cells were infected with a EF1A-Luciferase-p2A-GFP vector prior to EV treatments. Cells were trypsinized and resuspended on ice in a 1:1 of PBS: Matrigel mixture. Female nu/nu athymic mice were anesthetized with isoflurane and injected with 500,000 A549 cells, 10,000 A375 cells or a mixture of 100,000 A549 and 400,000 MRC5 cells, or 1,000,000 A375 cells with different mutation (for IHC) in 100  $\mu$ l subcutaneously into the left flank. Primary tumor growth was monitored by imaging weekly using the IVIS Spectrum CT Pre-Clinical In Vivo Imaging System (Perkin-Elmer), and luminescence was measured and quantified using Living Image Software v.4.5 (Perkin-Elmer). To visualize metastatic spread, mice were sacrificed at the endpoint of 5 weeks and organs, including livers, lungs, brains, spleens and kidneys, were placed into 12-well plates and imaged using the IVIS Spectrum CT Pre-Clinical In Vivo Imaging System (Perkin-Elmer), and luminescence was measured and quantified using Living Image Software v.4.5 (Perkin-Elmer).

#### Statistics and reproducibility

All measurements used for statistical analyses in independent experiments were taken from distinct samples. Data analyses were performed using Microsoft Excel 2013 and GraphPad Prism7. Unless otherwise specified, results are expressed as mean  $\pm$  SEM. The two-tailed Student's *t*-test, one-way ANOVA and two-way ANOVA were used to determine significance. For all western blots, experiments were independently repeated *n* = 3 times and representative images are



shown. Sample sizes for mouse experiments were chosen based on power calculations using expected results. No data were excluded from the analyses. Mice and cells were randomized before allocation into different experimental groups. The investigators were not blinded to allocation during experiments and outcome assessment.

### Reporting summary

Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

### Data availability

All data generated or analyzed during this study are included in this published paper (and its supplementary information files) under the Source Data file, or has been previously published as described in the Methods. The RNA-seq data generated in this study have been deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO) repository under accession code [GSE190929](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE190929). All raw data files, peak lists, and the sequence database for the proteomics analysis have been deposited in the MassIVE repository (<https://massive.ucsd.edu>) under ID MSV000090312. All the other data are available within the paper and its Supplementary Information. Source data are provided with this paper.

### Code availability

The quantification of invasion/migration assay images were carried out in an automated way on Fiji/ImageJ v1.52. The scrip was deposited into GitHut (<https://doi.org/10.5281/zenodo.7143661>).

### References

- Sandru, A., Voinea, S., Panaitescu, E. & Blidaru, A. Survival rates of patients with metastatic malignant melanoma. *J. Med. Life* **7**, 572–576 (2014).
- Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J. Clin.* **68**, 7–30 (2018).
- Gomes, A. P. et al. Altered propionate metabolism contributes to tumour progression and aggressiveness. *Nat. Metab.* **4**, 435–443 (2022).
- Anderson, N. M. & Simon, M. C. The tumor microenvironment. *Curr. Biol.* **30**, R921–R925 (2020).
- Sahai, E. et al. A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nat. Rev. Cancer* **20**, 174–186 (2020).
- Fiori, M. E. et al. Cancer-associated fibroblasts as abettors of tumor progression at the crossroads of EMT and therapy resistance. *Mol. Cancer* **18**, 70 (2019).
- Chen, Y., McAndrews, K. M. & Kalluri, R. Clinical and therapeutic relevance of cancer-associated fibroblasts. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **18**, 792–804 (2021).
- Beerling, E. et al. Plasticity between Epithelial and Mesenchymal States Unlinks EMT from Metastasis-Enhancing Stem Cell Capacity. *Cell Rep.* **14**, 2281–2288 (2016).
- Brabletz, T. et al. Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98**, 10356–10361 (2001).
- Keyfi, F., Sankian, M., Moghaddassian, M., Rolfs, A. & Varasteh, A. R. Molecular, biochemical, and structural analysis of a novel mutation in patients with methylmalonyl-CoA mutase deficiency. *Gene* **576**, 208–213 (2016).
- Bikker, H. et al. A homozygous nonsense mutation in the methylmalonyl-CoA epimerase gene (MCEE) results in mild methylmalonic aciduria. *Hum. Mutat.* **27**, 640–643 (2006).
- Dobson, C. M. et al. Identification of the gene responsible for the cblA complementation group of vitamin B12-responsive methylmalonic acidemia based on analysis of prokaryotic gene arrangements. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99**, 15554–15559 (2002).
- Jorge-Finnigan, A. et al. Functional and structural analysis of five mutations identified in methylmalonic aciduria cblB type. *Hum. Mutat.* **31**, 1033–1042 (2010).
- Huelsken, J., Hanahan, D. & Subset, A. of Cancer-Associated Fibroblasts Determines Therapy Resistance. *Cell* **172**, 643–644 (2018).
- Gomes, A. P. et al. Age-induced accumulation of methylmalonic acid promotes tumour progression. *Nature* **585**, 283–287 (2020).
- Winkler, J., Abisoye-Ogunniyan, A., Metcalf, K. J. & Werb, Z. Concepts of extracellular matrix remodelling in tumour progression and metastasis. *Nat. Commun.* **11**, 5120 (2020).
- Wendler, F. et al. Extracellular vesicles swarm the cancer microenvironment: from tumor-stroma communication to drug intervention. *Oncogene* **36**, 877–884 (2017).
- Luga, V. et al. Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration. *Cell* **151**, 1542–1556 (2012).
- Gyamfi, J., Lee, Y. H., Eom, M. & Choi, J. Interleukin-6/STAT3 signalling regulates adipocyte induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells. *Sci. Rep.* **8**, 8859 (2018).
- Ara, T. et al. Interleukin-6 in the bone marrow microenvironment promotes the growth and survival of neuroblastoma cells. *Cancer Res.* **69**, 329–337 (2009).
- Salgado, R. et al. Circulating interleukin-6 predicts survival in patients with metastatic breast cancer. *Int. J. Cancer* **103**, 642–646 (2003).
- Freudlsperger, C. et al. TGF-beta and NF-kappaB signal pathway cross-talk is mediated through TAK1 and SMAD7 in a subset of head and neck cancers. *Oncogene* **32**, 1549–1559 (2013).
- Morgan, M. J. & Liu, Z. G. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling. *Cell Res.* **21**, 103–115 (2011).
- Liu, R. M. & Desai, L. P. Reciprocal regulation of TGF-beta and reactive oxygen species: a perverse cycle for fibrosis. *Redox Biol.* **6**, 565–577 (2015).
- Dutra, J. C. et al. Inhibition of succinate dehydrogenase and beta-hydroxybutyrate dehydrogenase activities by methylmalonate in brain and liver of developing rats. *J. Inher. Metab. Dis.* **16**, 147–153 (1993).
- Luciani, A. et al. Impaired mitophagy links mitochondrial disease to epithelial stress in methylmalonyl-CoA mutase deficiency. *Nat. Commun.* **11**, 970 (2020).
- Martinez-Outschoorn, U. E. et al. Oxidative stress in cancer associated fibroblasts drives tumor-stroma co-evolution: A new paradigm for understanding tumor metabolism, the field effect and genomic instability in cancer cells. *Cell Cycle* **9**, 3256–3276 (2010).
- Weinberg, F., Ramnath, N. & Negrath, D. Reactive oxygen species in the tumor microenvironment: an overview. *Cancers (Basel)* **11**, 1191 (2019).
- Ersler, W. B. et al. Interleukin-6 and aging: blood levels and mononuclear cell production increase with advancing age and in vitro production is modifiable by dietary restriction. *Lymphokine Cytokine Res.* **12**, 225–230 (1993).
- Kumari, N., Dwarakanath, B. S., Das, A. & Bhatt, A. N. Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. *Tumour Biol.* **37**, 11553–11572 (2016).
- Li, Q. et al. Determination of Cytokines and Oxidative Stress Biomarkers in Cognitive Impairment Induced by Methylmalonic Acidemia. *Neuroimmunomodulation* **28**, 1–9 (2021).
- Fitzgerald, W. et al. A System of Cytokines Encapsulated in Extracellular Vesicles. *Sci. Rep.* **8**, 8973 (2018).
- Wang, G. et al. STAT3 selectively interacts with Smad3 to antagonize TGF-beta signalling. *Oncogene* **35**, 4422 (2016).

34. Saitoh, M. et al. STAT3 integrates cooperative Ras and TGF- $\beta$  signals that induce Snail expression. *Oncogene* **35**, 1049–1057 (2016).
35. Murtha, L. A. et al. The Role of Pathological Aging in Cardiac and Pulmonary Fibrosis. *Aging Dis.* **10**, 419–428 (2019).
36. Laughney, A. M. et al. Regenerative lineages and immune-mediated pruning in lung cancer metastasis. *Nat. Med.* **26**, 259–269 (2020).
37. Thery, C., Amigorena, S., Raposo, G. & Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr. Protoc. Cell Biol.* Chapter 3, Unit 3.22 (2006).
38. Rappsilber, J., Ishihama, Y. & Mann, M. Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Anal. Chem.* **75**, 663–670 (2003).
39. Eng, J. K., Jahan, T. A. & Hoopmann, M. R. Comet: an open-source MS/MS sequence database search tool. *Proteomics* **13**, 22–24 (2013).
40. Elias, J. E. & Gygi, S. P. Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry. *Nat. Methods* **4**, 207–214 (2007).
41. Tyanova, S. & Cox, J. Perseus: A Bioinformatics Platform for Integrative Analysis of Proteomics Data in Cancer Research. *Methods Mol. Biol.* **1711**, 133–148 (2018).
42. Dobin, A. et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**, 15–21 (2013).
43. Trapnell, C. et al. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat. Biotechnol.* **28**, 511–515 (2010).
44. Trapnell, C. et al. Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. *Nat. Biotechnol.* **31**, 46–53 (2013).
45. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **15**, 550 (2014).

## Acknowledgements

We are grateful to members of the Blenis and Cantley Laboratories for critical input on this project. Elena Piskounova kindly provided luciferase plasmid for xenograft experiments. This research was supported by the following grants: R01GM051405 (J.B.), R01CA46595 (J.B.). C.-J.G. is supported by the AGA Research Foundation, WCM-RAPP Initiative, The W. M. Keck Foundation, the National Institutes of Health (DP2 HD101401-01). A.L. is funded by R01CA256188-01. V.Luga is funded by Canadian Institutes of Health Research (CIHR) fellowship. The authors acknowledge the assistance of the staff at the Microscopy & Image Analysis Core at WCM. TEM was purchased with funds from an NIH Shared Instrumentation Grant (S1ORRO27699).

## Author contributions

Z.L., V.Low, and J.B. conceived and supervised the project. Z.L. and V.Low. performed most of the cell culture, molecular biology experiments, the EMT-related experiments, the invasion and migration experiments, drug resistance and the mouse experiments. V.Low. pre-

pared the RNA for RNA-seq, generated the viral particles for knock-downs, generated the genetically modified cell lines, and performed qPCR analyses. E.E and A.L performed patient single cell data analysis. M.H. performed EVs quantification by Nano Sight. J.S. and V.Luga performed Electron Microscopy analysis of EVs and quantification of particle size. W.J. and C.-J.G. performed mass-spec analysis. N.D. performed proteomic analysis. K.G. assisted in data analysis. B.P., J. E., S.C. and T.S. assisted in some cell culture and molecular experiments. Z.L., V.Low., and J.B. analyzed the data. D.L. and L.C.C. oversaw experiments and provided feedback. The paper was written by Z.L., V.Low., and J.B., and edited by A.L. and V.Luga. All authors discussed the results and approved the paper.

## Competing interests

L.C.C. owns equity in, receives compensation from and serves on the board of directors and scientific advisory board of Agios Pharmaceuticals and Petra Pharma Corporation. The other authors declare no competing interests.

## Additional information

**Supplementary information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33862-0>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to John Blenis.

**Peer review information** *Nature Communications* thanks the anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work. Peer reviewer reports are available.

**Reprints and permission information** is available at <http://www.nature.com/reprints>

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2022

<sup>1</sup>Meyer Cancer Center, Weill Cornell Medicine, New York, NY 10021, USA. <sup>2</sup>Department of Pharmacology, Weill Cornell Medicine, New York, NY 10021, USA. <sup>3</sup>Department of Medicine, Weill Cornell Medicine, New York, NY 10021, USA. <sup>4</sup>Institute for Computational Biomedicine, Weill Cornell Medicine, New York, NY, USA. <sup>5</sup>Department of Biochemistry, Weill Cornell Medicine, New York, NY 10021, USA. <sup>6</sup>Departments of Pediatrics, and Cell and Developmental Biology, Weill Cornell Medicine, New York, NY 10021, USA. <sup>7</sup>Jill Roberts Institute for Research in Inflammatory Bowel Disease, Department of Medicine, Weill Cornell Medicine, New York, NY 10021, USA. <sup>8</sup>Department of Physiology and Biophysics, Weill Cornell Medicine, New York, NY 10021, USA. <sup>9</sup>Present address: Department of Radiology, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY 10065, USA. <sup>10</sup>Present address: Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA 02215, USA. <sup>11</sup>These authors contributed equally: Zhongchi Li, Vivien Low. ✉ e-mail: [job2064@med.cornell.edu](mailto:job2064@med.cornell.edu)