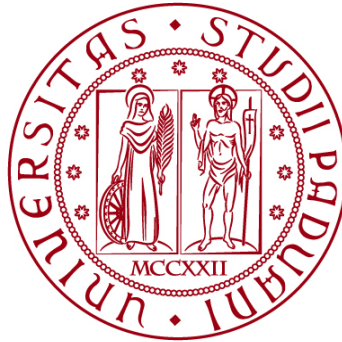


**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA**

**Corso di Laurea in Biologia Molecolare**



**ELABORATO DI LAUREA**

# **Conversione del fruttosio in acetato e l'impatto di questo per la steatosi epatica**

**Tutor: Dott. Alessandro Carrer  
Dipartimento di Biologia**

**Co-tutor: Dott.ssa Roberta Noè  
Dipartimento di Biologia**

**Laureando: Riccardo Cebin**

**ANNO ACCADEMICO 2023/2024**



## Sommario

<b>ABSTRACT</b> .....	5
<b>STATO DELL'ARTE</b> .....	6
Introduzione .....	6
De – novo lipogenesi e steatosi epatica .....	6
Metabolismo del fruttosio.....	7
Fruttosio e induzione della DNL e la steatosi epatica .....	9
<b>APPROCCIO SPERIMENTALE</b> .....	10
Topi transgenici .....	10
Western blot .....	10
Tecniche istologiche .....	11
Tracciamento con isotopi .....	12
RT-qPCR.....	12
LC-MS .....	13
<b>RISULTATI E DISCUSSIONE</b> .....	15
La lipogenesi indotta dal fruttosio è ACLY – indipendente .....	15
L'acetato prodotto dal microbiota alimenta la lipogenesi .....	16
Segnali e substrati lipogenici .....	18
Discussione critica .....	20
<b>APPROFONDIMENTO ATTIVITÀ DI STAGE</b> .....	22
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	25
<b>APPENDICE</b> .....	27



## **ABSTRACT**

L'eccessivo consumo di fruttosio è correlato all'insorgenza di diverse patologie, tra cui la steatosi epatica (NAFLD). Questa malattia è caratterizzata dalla produzione e accumulo di lipidi nel fegato. Il processo di de – novo lipogenesi (DNL) porta alla conversione di precursori carbonilici in acidi grassi. Due sono gli enzimi principalmente coinvolti in questo processo: ATP citrato liasi (ACLY) e acetil-CoA sintetasi 2 (ACSS2). Il primo enzima converte il citrato in acetil-CoA, il secondo utilizza invece l'acetato per sintetizzare acetil-CoA. Nell'articolo esaminato gli autori hanno investigato la dipendenza della DNL dall'azione di ACLY, evidenziando come questo processo possa avvenire anche se il gene *Acly* viene deleto nel fegato. In assenza di ACLY diventa fondamentale però l'azione di ACSS2, in quanto può sfruttare acetato prodotto dal microbiota intestinale tramite fermentazione del fruttosio ingerito. La delezione di ACSS2 o l'inibizione del microbiota intestinale portano invece ad una soppressione della de – novo lipogenesi alimentata dal fruttosio alimentare. Gli autori hanno quindi indagato questo doppio meccanismo di induzione della DNL in risposta all'ingestione di fruttosio, che richiede sia un segnale in grado di promuovere l'espressione di geni lipogenici, sia di un sistema in grado di produrre il substrato per la lipogenesi stessa.

# STATO DELL'ARTE

## Introduzione

Negli ultimi anni il consumo di fruttosio è aumentato notevolmente, principalmente a causa del consumo di cibi e bevande contenenti High Fructose Corn Syrup (HFCS). Esso è una miscela contenente sia fruttosio che glucosio, ma in quantità ineguale con una percentuale maggiore di fruttosio (dal 55% al 65%), a discapito del glucosio. Ciò rappresenta un notevole problema per la salute pubblica, in quanto il consumo elevato di questo dolcificante, e più in generale del fruttosio, è collegato all'insorgenza di diverse patologie tra cui l'obesità, la steatosi epatica (NAFLD – nonalcoholic fatty liver disease) e la steatoepatite non alcolica (NASH)<sup>1,4</sup>.

In particolare, elevate quantità di fruttosio stimolano nel fegato il processo di de novo lipogenesi (DNL), attraverso cui avviene la sintesi di nuovi acidi grassi da precursori carboniosi. Parallelamente, si riduce l'ossidazione degli acidi grassi, portando al loro accumulo. Favorendo la DNL, principale causa della steatosi epatica, il fruttosio contribuisce alla progressione di tale patologia.

## De – novo lipogenesi e steatosi epatica

La de – novo lipogenesi è il processo mediante il quale nuovi acidi grassi vengono sintetizzati a partire da precursori carboniosi dell'acetil – CoA, solitamente carboidrati o altri depositi energetici. Un elevato consumo di fruttosio induce la DNL sia attraverso intermedi della via glicolitica che di degradazione del fruttosio stesso, fornendo il substrato per la sintesi di acidi grassi e trigliceridi, che attivano i sistemi di segnalazione per stimolare la produzione di lipidi<sup>3</sup>.

Il primo enzima della DNL è l'ATP citrato liasi (ACLY). L'azione di questo enzima è regolata dalla nutrizione, con un'espressione relativamente bassa nel digiuno e un notevole aumento dopo l'assunzione di cibo, soprattutto quando l'alimentazione prevede una dieta ad alto contenuto di carboidrati. Il processo di DNL può essere suddiviso in tre fasi sequenziali: sintesi degli acidi grassi, allungamento/insaturazione degli acidi grassi e assemblaggio in trigliceridi. L'accumulo epatico di lipidi deriva dall'insieme di aumento della lipogenesi de novo epatica, dall'esterificazione di acidi grassi preformati, diminuzione della secrezione di VLDL (very low-density lipoprotein) e riduzione dell'ossidazione degli acidi grassi.

La de – novo lipogenesi svolge un ruolo molto importante durante lo sviluppo embrionale, infatti un'inibizione globale dell'acido grasso sintasi (FAS) è letale. Una delezione di questo enzima solo a livello epatico, in presenza di una dieta ricca di carboidrati, porta allo sviluppo di steatosi epatica.

Gli effetti pro-ossidativi e pro-infiammatori dell'acido urico (sintetizzato a causa dell'ingestione di fruttosio) determinano un aumento della permeabilità intestinale e della concentrazione di endotossine, che favoriscono il processo lipogenico nel fegato e, insieme alla disfunzione mitocondriale, determinano l'insorgenza della NAFLD<sup>1</sup>.

La steatosi epatica (NAFLD) è la manifestazione epatica di una sindrome metabolica e si stima che colpisca 1 miliardo di persone nel mondo. Questa viene definita come un eccessivo accumulo di lipidi nel fegato, in individui che non possiedono nessun'altra malattia epatica, e la cui assunzione di alcol è inferiore ad una certa soglia (30 grammi al giorno per gli uomini e 20 grammi al giorno per le donne). In condizioni fisiologiche la quantità di grasso negli epatociti è <5%, quando i valori superano questa soglia si ha la condizione di steatosi. Un segno che contraddistingue la NAFLD è infatti l'accumulo di trigliceridi all'interno degli epatociti<sup>2</sup>.

L'aumento della DNL è un'anomalia centrale nella steatosi epatica, e questo processo è significativamente aumentato nei soggetti con NAFLD rispetto ai controlli sani. Nei soggetti con quantità di grasso epatico nella norma, gli acidi grassi liberi derivati dal tessuto adiposo rappresentano la porzione maggiore dei trigliceridi epatici. Il contributo di questa via non è aumentato nei soggetti con NAFLD, nei quali invece aumenta notevolmente la porzione di acidi grassi derivanti dalla de – novo lipogenesi epatica<sup>2</sup>.

Nel complesso, gli studi di knockout di singoli enzimi nei topi supportano un legame chiave tra la de – novo lipogenesi e lo sviluppo della NAFLD, in quanto perturbazioni nell'espressione di determinati geni, nella maggior parte dei casi, alterano la tendenza a sviluppare la steatosi epatica. Inoltre, gli enzimi della DNL sono regolati dal punto di vista nutrizionale, e diete ricche di carboidrati generalmente permettono di superare la perdita di un singolo enzima e di mantenere la lipogenesi epatica. Studi sui topi knockout dimostrano che la DNL è diminuita in alcuni casi e aumentata in altri. Questi risultati suggeriscono che la composizione epatica degli acidi grassi, piuttosto che l'accumulo totale di trigliceridi epatici, è importante per lo sviluppo e la progressione della NAFLD<sup>2</sup>.

La steatosi epatica può portare a morte cellulare, infiammazione e sfociare in steatoepatite (NASH, che a sua volta può peggiorare); non è però una condizione irreversibile, in quanto si può guarire. La NAFLD è la terza causa di trapianto di fegato, ed è fortemente collegata ad altre sindromi metaboliche e malattie cardiovascolari<sup>2,4</sup>.

### Metabolismo del fruttosio

La concentrazione di fruttosio nel sangue è circa 0,04 mM, ma può aumentare di 10 volte dopo l'assunzione di fruttosio, per tornare ai livelli di digiuno entro 2 ore. Questa rapida eliminazione è mediata in gran parte dal fegato<sup>3</sup>.

Il metabolismo del fruttosio è piuttosto simile a quello del glucosio; le uniche differenze sono presenti nelle prime due reazioni enzimatiche, che mediano la degradazione dei due zuccheri (via fruttolitica quella del fruttosio, via glicolitica quella del glucosio). Il fruttosio reagisce prima con la fruttochinasi (isoforma C nel fegato e nell'intestino tenue), detta anche chetoesochinasi (KHK) e si ottiene come prodotto il fruttosio-1-fosfato F1P. Questo reagisce con la aldolasi B, per ottenere diidrossiacetone fosfato (DHAP) e gliceraldeide-3-fosfato (G3P). A questo punto le vie del catabolismo di glucosio e fruttosio si sovrappongono, e i metaboliti di

entrambi questi zuccheri possono entrare nel ciclo dell'acido citrico per produrre energia<sup>3</sup>.

La principale isoforma della fruttochinasi nel fegato è la fruttochinasi C, che fosforila il fruttosio rapidamente e senza alcun controllo di retroazione negativa, provocando una diminuzione dell'ATP e del fosfato intracellulare. La carenza di ATP a causa dell'azione della fruttochinasi porta ad una serie di reazioni intracellulari, come il blocco della sintesi proteica o l'induzione di stress ossidativo e disfunzione mitocondriale. La diminuzione del fosfato intracellulare attiva l'enzima AMP deaminasi, che converte l'AMP in IMP, dando luogo a un turnover dei nucleotidi purinici che termina con la formazione di acido urico. Il fruttosio stimola anche la sintesi di acido urico da precursori amminoacidici.

I metaboliti derivanti dal fruttosio entrano direttamente nel pool del trioso-fosfato in quanto non sono soggetti all'azione della fosfofruttochinasi (PFK). Poiché la via fruttolitica epatica non è limitata, i carichi di fruttosio possono portare a grandi e rapide espansioni dei pool dell'esoso e del trioso-fosfato, fornendo potenzialmente un maggiore substrato per tutte le principali vie metaboliche del carbonio tra cui glicolisi, glicogenesi, gluconeogenesi, lipogenesi e fosforilazione ossidativa.

Oltre a fornire substrato per i processi metabolici, il metabolismo epatico del fruttosio genera metaboliti specifici che svolgono anche funzioni di segnalazione<sup>3</sup>.

Il fruttosio proveniente dalla dieta viene rapidamente assorbito a livello di intestino tenue grazie al trasportatore GLUT5 e una sua delezione comporta una riduzione dell'assorbimento del 75%<sup>3</sup>. Quando viene assunto in quantità eccessiva, ciò che non viene assorbito nel lume intestinale raggiunge il colon, e qui viene convertito dal microbiota intestinale in acetato. L'acetato così prodotto viene utilizzato nel fegato come substrato per ottenere prima acetil – CoA e poi acidi grassi. Elevate dosi di fruttosio possono causare quella che viene definita disbiosi del microbiota intestinale, ovvero un'alterazione della sua composizione, aumentando così la permeabilità intestinale e favorendo sia l'insorgenza che la progressione della steatosi epatica<sup>1</sup>.

L'acetil coenzima A è una molecola chiave nel metabolismo cellulare. Esso è coinvolto in numerosi processi come il metabolismo di lipidi e carboidrati, ma funge anche da donatore di gruppi acetili. L'acetil-CoA può derivare da differenti fonti energetiche, tra cui anche il fruttosio, e può essere prodotto nelle nostre cellule attraverso due enzimi: l'ATP citrato liasi (ACLY) e l'acetil-CoA sintetasi 2 (ACSS2). Mentre ACLY converte il citrato mitocondriale proveniente dal ciclo di Krebs in acetil-CoA, ACSS2 produce acetil-CoA a partire dall'acetato citosolico. Questo è il primo step per la sintesi endogena di acidi grassi. L'acetil-CoA può essere convertito in malonil-CoA per azione dell'enzima ACC1 (acetil – CoA carbossilasi), dando inizio al processo di de – novo lipogenesi. Inoltre il citrato rappresenta un attivatore allosterico per ACC1, favorendone l'azione. Il malonil-CoA è il principale substrato utilizzato per la sintesi di acidi grassi: l'acido grasso sintasi (FAS) sfrutta in sequenza più molecole di malonil-CoA per allungare la catena in crescita, fino a produrre un acido grasso 16C saturo (il palmitato, il principale prodotto della sintesi degli acidi grassi). L'acido palmitico potrà poi essere ulteriormente allungato o reso insaturo. Spesso l'azione di ACC svolge un ruolo di regolazione nella sintesi lipidica, in quanto l'accumulo di malonil-CoA (elevati tassi di DNL) inibisce l'enzima CTP1 $\alpha$ , che è responsabile di regolare la velocità di trasporto e consumo degli acidi grassi all'interno dei mitocondri<sup>2</sup>.



## Fruttosio e induzione della DNL e la steatosi epatica

Un consumo eccessivo di fruttosio ha effetti significativi sul metabolismo lipidico, contribuendo sia alla steatosi sia all'aumento dei livelli di trigliceridi circolanti sotto forma di VLDL. L'accumulo epatico di lipidi deriva da una combinazione di aumento della DNL, esterificazione degli acidi grassi preformati derivati dalla dieta (o dai depositi adiposi), diminuzione della secrezione di VLDL e riduzione della  $\beta$ -ossidazione epatica degli acidi grassi. L'attivazione del programma lipogenico si osserva immediatamente dopo l'assunzione di fruttosio e contribuisce all'aumento della secrezione di trigliceridi. Pertanto, contribuisce alla de-novo lipogenesi sia fornendo il substrato per la sintesi di acidi grassi e trigliceridi, sia attivando i sistemi di segnalazione per aumentare la produzione di lipidi<sup>4</sup>.

Quando il fruttosio viene assunto in modo graduale, sia il citrato dovuto all'assorbimento intestinale, che l'acetato prodotto dal microbiota, contribuiscono entrambi alla lipogenesi. I trigliceridi prodotti in eccesso vengono secreti dal fegato nelle VLDL (aumenta il tasso di secrezione) che fungono da trasportatore di lipidi endogeni nel plasma<sup>4</sup>. Studi con traccianti hanno dimostrato che il fruttosio viene incorporato in modo massiccio sia nel glicerolo che negli acidi grassi liberi, i due componenti dei trigliceridi; il glucosio non è stato incorporato nei trigliceridi.

Se il consumo è ridotto il contributo principale alla produzione di nuovo acetyl-CoA è dovuto all'azione di ACLY; Nel caso di un massiccio ingresso di fruttosio, invece diventa fondamentale anche il contributo del microbiota (produce acetato) e di ACS2 (produce nuovo acetyl-CoA utilizzando come substrato i prodotti del metabolismo del microbiota). Dopo il consumo elevato di fruttosio vengono sovraespressi i fattori di trascrizione ChREBP (isoforma  $\beta$ ) e SREBP1c, alcuni geni lipogenici, e anche a livello proteico si ha una differente espressione degli enzimi lipogenici come ACLY e ACS2. In particolare ChREBP- $\beta$  è molto importante in quanto collega il metabolismo dei carboidrati con la sintesi lipidica e inibisce la  $\beta$ -ossidazione degli acidi grassi. SREBP1c invece ha un ruolo fondamentale nel promuovere la sintesi dei lipidi<sup>4</sup>.

È stato evidenziato che elevate dosi di fruttosio sono in grado di alterare il microbiota intestinale e di aumentare la permeabilità intestinale attraverso la perdita delle giunzioni strette. Questo favorisce l'insorgenza della NALFD e porta alla progressione della malattia<sup>1</sup>.

Il fruttosio sopprime anche acutamente l'ossidazione epatica degli acidi grassi. Pertanto, contribuisce alla produzione epatica di trigliceridi sia fornendo il substrato per la sintesi di acidi grassi e trigliceridi, sia attivando i sistemi di segnalazione per aumentare la produzione di lipidi<sup>4</sup>.

## APPROCCIO SPERIMENTALE

### Topi transgenici

Con i termini topi transgenici si intendono dei topi che possiedono delle modifiche al proprio genoma, siano esse delle inserzioni di sequenze esogene, delle delezioni o delle inversioni. Questo permette di effettuare studi *in vivo* su animali esprimenti proteine eterologhe, oppure osservare gli effetti della delezione di una determinata sequenza. Le linee di topi transgenici vengono prodotte da degli istituti specializzati, in quanto le mutazioni devono essere rese stabili in tutte le generazioni. Esistono diverse tecniche per creare topi transgenici, le tecniche attualmente più utilizzate sfruttano meccanismi di ricombinazione omologa a livello di cellule embrionali staminali (ES), utilizzate poi per originare la linea transgenica. La ricombinazione è mediata da enzimi di restrizione e ricombinasi, come il sistema Cre/lox o il sistema Flp/FRP, associati all'utilizzo di una sequenza che funge da vettore donatore della sequenza. Molto spesso, come negli esperimenti affrontati dall'articolo, queste mutazioni sono tessuto – specifiche, in quanto possono risultare letali se presenti a livello di intero organismo.

In questo caso specifico è stato necessario produrre dei topi che presentavano una delezione del gene *Acly* (codificante l'enzima ACLY) in modo specifico negli epatociti (topi LAKO). Una delezione whole-body è letale a livello di embrione.

Per fare ciò sono stati incrociati dei topi *Acly*<sup>fl/fl</sup> (con background C57Bl6/J) con dei topi albumin-Cre (B6.Cg<sup>Tg(Alb-cre)21Mgn/J</sup>). L'effetto finale è quello di ottenere una proteina ACLY tronca (e inattiva) a causa di una mutazione all'esone 9 di *Acly* specifica per gli epatociti<sup>5</sup>.

### Western blot

Il Western Blot è una tecnica immunochimica che permette di separare e isolare tra loro proteine sulla base di differenti caratteristiche. Il materiale di partenza è un lisato cellulare dal quale sono stati rimossi i detriti cellulari, le membrane e gli organelli (a meno che non si vogliano analizzare proteine presenti in specifici distretti cellulari). Avviene una prima separazione sulla base delle dimensioni e del peso molecolare grazie ad una elettroforesi in condizioni denaturanti (SDS-PAGE), in modo che la separazione avvenga in presenza di un campo elettrico solo sulla base del differente peso molecolare delle proteine che vengono analizzate. Per ogni pozzetto viene caricata una quantità uguale di proteina (quantificate precedentemente allo spettrofotometro) e si utilizza anche un marcatore di peso molecolare, con bande a pesi molecolari noti, per confrontare poi il peso delle proteine. Le proteine migrano dal polo negativo (catodo) al polo positivo (anodo). Le proteine di maggiori dimensioni, e quindi dal peso molecolare maggiore, migreranno più lentamente, mentre quelle più leggere migreranno più rapidamente all'interno del gel.

Dopo questa prima separazione segue il trasferimento delle proteine in una membrana di PVDF o di nitrocellulosa. Anche questo trasferimento avviene

secondo un campo elettrico, sempre dall'catodo all'anodo. Per il trasferimento si crea un "sandwich" ossia una struttura che mantenga il gel elettroforetico e la membrana di trasferimento in stretto contatto, garantendo anche il passaggio di corrente. La membrana sarà verso il polo positivo, in modo che il trasferimento proteico avvenga una volta applicata la differenza di potenziale. Esistono diverse tecniche di trasferimento sulla membrana, con efficienze di trasferimento e velocità differenti. Una volta avvenuto il trasferimento le membrane vengono incubate con un anticorpo primario, in grado di riconoscere un determinato epitopo sulle proteine presenti sulla membrana. Le membrane possono anche venir tagliate per effettuare analisi differenti su proteine diverse (con pesi molecolari ben distinti) presenti su una stessa membrana.

L'anticorpo primario può essere coniugato ad un fluoroforo o ad un enzima (metodo diretto), oppure può venir riconosciuto da un altro anticorpo, detto anticorpo secondario, che sarà associato ad un composto fluorescente o ad un enzima (metodo indiretto). La tecnica diretta è più rapida (richiede meno passaggi) e meno costosa, mentre quella indiretta permette l'amplificazione del segnale e quindi ha una sensibilità molto maggiore, ed è più versatile. Oltre all'incubazione con gli anticorpi è necessario anche bloccare (saturare) i siti di legame aspecifici che potrebbero venir riconosciuti in modo errato dall'anticorpo. Questo passaggio avviene sfruttando una Blocking solution generalmente a base di BSA (albumina di siero bovino) o di latte. I risultati possono essere poi visualizzati al transilluminatore in cameretta oscura eccitando la membrana con la corretta lunghezza d'onda ( $\lambda$ ). Se si vogliono fare analisi riguardo alla presenza di una stessa proteina in condizioni sperimentali differenti, bisogna sempre analizzare anche una proteina che funge da controllo (normalizzatore), ossia espressa in modo identico nelle due diverse condizioni sperimentali, per verificare che effettivamente quanto emerge dal blot sia dovuto alle condizioni in esame e non a problemi di caricamento.

Nell'articolo, tramite la tecnica del Western Blot si valuta la diversa espressione delle proteine FASN, ACC, ACLY e ACSS2, mentre il controllo è la proteina ribosomale S6.

### Tecniche istologiche

Le tecniche istologiche sono un insieme di tecniche di laboratorio che si applicano su campioni di tessuto. Si avvalgono di diverse tipologie di coloranti che permettono di evidenziare le strutture cellulari di interesse. Più colorazioni possono essere combinate tra di loro. I campioni trattati con queste tecniche devono prima essere fissati, e una volta avvenuta la colorazione possono essere osservati al microscopio ottico. Gli esperimenti svolti nell'articolo utilizzano due di queste tecniche: ematossilina – eosina e oil red O.

La tecnica dell'ematossilina – eosina (H&E) sfrutta due coloranti diversi: l'ematossilina (colorazione viola, identifica i nuclei) e l'eosina (colorazione rosa, colora il citoplasma). La tecnica dell'oil red O invece colora in rosso acidi neutri, acidi grassi e trigliceridi (ma non fosfolipidi e glicolipidi di membrana).

## Tracciamento con isotopi

Gli isotopi di un elemento sono atomi che possiedono lo stesso numero atomico, ma un diverso numero di massa, di conseguenza differiscono nel numero di neutroni. Spesso gli isotopi hanno proprietà radioattive, vanno incontro a decadimento radioattivo, e quindi possono essere facilmente identificati. L'acqua deuterata ( $D_2O = {}^2H_2O$ ) è un ottimo tracciante, largamente utilizzato per misurare i tassi di DNL. L'arricchimento dei lipidi di nuova sintesi con  ${}^2H$  può essere misurato tramite spettroscopia NMR o MS<sup>6</sup>. In alternativa, come fatto negli esperimenti analizzati nell'articolo in esame, sono stati utilizzati [ ${}^{13}C$ ] marcati presenti all'interno di glucosio e fruttosio, somministrati disciolti nell'acqua. Gli isotopi utilizzati per le analisi di routine, come  ${}^2H$  o  ${}^{13}C$ , sono degli isotopi stabili, e perciò non vanno incontro a decadimento.

L'utilizzo di atomi marcati permette di seguire i vari passaggi ai quali va incontro una molecola, seguire i vari step del suo metabolismo e capire come diversi intermedi possono essere convertiti tra di loro. Si può determinare il tasso di sintesi degli acidi grassi grazie al rapporto di arricchimento, ossia il numero di  ${}^{13}C$  presenti nella molecola sul numero di carboni totali. Il peso della singola molecola può essere a sua volta ottenuto sfruttando metodi di misurazione del peso molecolare, il quale può variare in base alla quantità di isotopi presenti<sup>6</sup>. In alternativa si può usare l'acqua  $D_2O$ , che negli ultimi anni sta riscontrando maggiore attenzione in quanto presenta numerosi vantaggi: costa meno rispetto ai monosaccaridi marcati, può essere somministrata per periodi di tempo più lunghi, non necessita di infusione, permette l'analisi in contemporanea di numerose reazioni metaboliche. Gli  ${}^2H$  marcati possono essere direttamente incorporati all'interno dell'acetil - CoA o essere impiegati dall'acido grasso sintasi (FAS). Tra gli svantaggi nell'uso dell'acqua deuterata c'è però il fatto che questa tecnica non permette di distinguere quali composti derivino da uno specifico substrato (cosa che invece era possibile effettuare con  ${}^{13}C$ )<sup>6</sup>.

## RT-qPCR

La real time PCR, o quantitative PCR (qPCR) è una tecnica che permette di monitorare in tempo reale la quantità di sequenze di DNA che vengono amplificate. Questa tecnica viene utilizzata per fare confronti riguardo al grado di espressione di differenti geni, e analizzare se sono presenti delle differenze di espressione in condizioni sperimentali diverse. Questa tecnica è spesso accoppiata ad un primo passaggio di retrotrascrizione (grazie all'enzima retrotrascrittasi virale RT), in modo da poter analizzare le quantità di trascritti (mRNA) presenti all'interno di un campione. In questo caso la PCR viene fatta quindi su cDNA. Per monitorare la quantità di amplificato che si genera ad ogni ciclo di PCR si sfruttano dei fluorofori che si intercalano al DNA, ed emettono un segnale fluorescente solo se associati al doppio filamento. Si misura a quale ciclo il segnale diventa rilevabile (quando il valore del segnale supera la soglia del valore di threshold), questo viene detto ciclo soglia e si indica con  $C_t$ . Questo valore dipende dalla quantità di mRNA inizialmente presente nel campione, perciò il  $C_t$  assumerà valori minori per geni

molto espressi, e avrà valori maggiori per geni meno espressi (quindi con meno trascritti).

Per essere sicuri che le differenze nei valori osservati di  $C_t$  tra 2 campioni o tra due condizioni sperimentali diverse siano effettivamente dovuti alle differenti condizioni si analizza sempre anche almeno un gene housekeeping (che funge da normalizzatore, detto anche gene reference), il quale non presenta differenze di espressione nelle diverse condizioni. Per stabilire quante volte un gene è più espresso rispetto ad un altro (o ad una diversa condizione sperimentale / tessuto diverso) si utilizza il metodo del  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . La formula tiene conto del valore di espressione del gene reference nelle 2 diverse condizioni. Questo metodo non fornisce un valore assoluto di espressione (poco utile nella maggior parte dei casi), ma consente di fare confronti.

Negli esperimenti condotti dagli autori l'intercalante che è stato utilizzato è il SYBR Green, con la relativa Mix di PCR. Come gene housekeeping è stato usato il gene endogeno codificante la proteina ribosomale 18S.

## LC-MS

La LC-MS è una tecnica sperimentale che unisce in successione tra loro 2 tecniche: la separazione tramite cromatografia liquida (LC) e poi l'analisi allo spettrometro di massa (MS). Così come avviene negli esperimenti effettuati dagli autori, l'analisi allo spettrometro di massa è preceduta da una separazione in cromatografia liquida e diverse tipologie di LC possono essere utilizzate in funzione dell'analisi che deve essere effettuata (a fase inversa, a interazione idrofila...). Questo primo passaggio è necessario in quanto i campioni sono spesso molto complessi, e quindi non potrebbero essere direttamente analizzati. Il campione viene iniettato all'interno della fase mobile (un solvente liquido), che poi attraverserà la colonna cromatografica. All'interno della colonna cromatografica è presente la fase stazionaria (solitamente contenete delle particelle di silice coniugate con altri composti, a seconda della natura della fase stazionaria). Durante il flusso della fase mobile attraverso la fase stazionaria, gli analiti contenuti nella fase mobile instaureranno con i componenti della fase stazionaria dei legami più o meno duraturi sulla base di interazioni chimiche o fisiche. L'intensità delle interazioni determina un rallentamento nel tempo di uscita dalla colonna, perciò tanto più forti sono le interazioni, tanto maggiore sarà il tempo di permanenza del composto all'interno della fase stazionaria. Il tempo di uscita di uno specifico analita dalla colonna cromatografica prende il nome di tempo di ritenzione (o volume di ritenzione). L'uscita degli analiti viene rilevata da un apposito strumento, il quale è uno spettrofotometro impostato ad una precisa lunghezza d'onda e il risultato è un grafico chiamato cromatogramma, il quale permette di identificare un composto e calcolarne la concentrazione.

La separazione delle componenti e la successiva analisi avvengono sulla base delle proprietà chimiche e fisiche dei metaboliti. La spettrometria di massa (MS) è una tecnica che permette di rilevare ioni allo stato gassoso. Le molecole in uscita dalla

colonna cromatografica devono essere prima vaporizzate e ionizzate, in quanto lo strumento rileva con elevata sensibilità il rapporto massa/carica ( $m/z$ ) e l'abbondanza relativa. Il rivelatore maggiormente usato è il moltiplicatore di elettroni, che è in grado di rilasciare degli elettroni secondari quando viene colpito dagli ioni di analita; la corrente amplificata che viene misurata è correlata alla quantità di ioni di quell'analita. Il risultato dell'analisi è un grafico che prende il nome di spettro di massa. Da questi dati si può poi risalire alla formula molecolare dei composti analizzati, in modo sempre più preciso. Quando applicata alla metabolomica (come negli esperimenti considerati in questo articolo), si concentra su molecole di piccole dimensioni.

La resa finale dell'analisi dipende anche dalla tipologia del metodo di ionizzazione utilizzato. Infatti la tecnologia ESI (electrospray, la più utilizzata in esperimenti di LC-MS) ha efficienze diverse per metaboliti diversi, e molti vengono ionizzati a bassa efficienza. Uno dei limiti principali di questa tecnica applicata all'intero metaboloma è proprio il basso coverage.

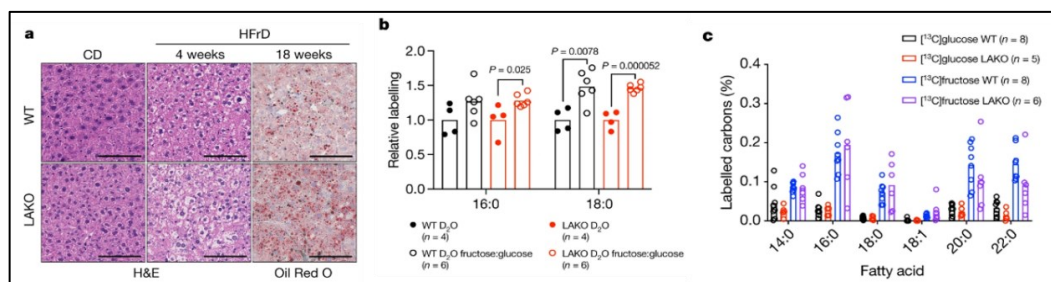
La LC-MS può essere usata in modo non mirato per scoprire quali molecole sono presenti in un campione, o mirata nei confronti di un determinato gruppo di composti. Con la LC-MS mirata si migliora la specificità, la sensibilità e le capacità di quantificazione dell'analisi. L'analisi mirata infatti permette l'utilizzo di isotopi stabili (SIL). Esistono tecniche in grado di utilizzare contemporaneamente più isotopi stabili in metaboliti diversi; i metaboliti e le reti metaboliche vengono marcati "in vivo" con isotopi pesanti arricchiti (come il  $^{13}\text{C}$  usato dagli autori). Di conseguenza, ogni metabolita marcato può potenzialmente fungere da standard interno. Questa tecnica viene chiamata etichettatura isotopica metabolica (MIL). Essa viene sfruttata per l'analisi quantitativa dei metaboliti, ma è anche uno strumento importante per l'analisi del flusso metabolico. La MIL può migliorare la quantificazione nell'analisi di particolari tipi di campioni, ma non può superare la limitazione del basso coverage<sup>7,8</sup>.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

In questo studio, i ricercatori hanno dimostrato che il fruttosio assunto con la dieta alimenta la de-novo lipogenesi nel fegato attraverso l'acetato, il quale viene prodotto dalla conversione del fruttosio da parte del microbiota intestinale.

### La lipogenesi indotta dal fruttosio è ACLY – indipendente

Come primo punto i ricercatori hanno interrogato l'azione dell'enzima ACLY, dimostrando che esso non è essenziale per la steatosi epatica indotta da un eccessivo consumo di frutto. Infatti, la sola delezione di *Acly* (specifico nel fegato) non è sufficiente a ridurre la quantità di metaboliti del fruttosio prodotti a livello epatico, e quindi neanche il conseguente accumulo di trigliceridi. A livello sperimentale, sono state impiegate due diverse linee di topi: una linea di topi C57Bl6/J wild-type (WT) e una linea nella quale è stato rimosso il locus genico *Acly* solo negli epatociti (da qui in avanti definiti topi LAKO). Per riprodurre l'eccessivo consumo di fruttosio, questi topi sono stati nutriti con una dieta classica ma con bevande contenenti fruttosio e glucosio in rapporto 1:1 (ciascuno al 15%), mantenendo acqua regolare come controllo. Dopo 4 settimane entrambe le tipologie di topi evidenziavano una moderata condizione di steatosi epatica. Parallelamente, esperimenti di tracciamento con isotopi hanno evidenziato come l'aumento della DNL avviene in modo paragonabile sia per i topi WT che per i topi LAKO. Questi risultati hanno portato a pensare che la delezione di *Acly* non previene la DNL nel fegato in risposta all'assunzione di fruttosio (Fig 1a-b). Dati questi risultati inaspettati, gli autori hanno successivamente deciso di testare direttamente l'effetto della delezione di ACLY nella conversione del fruttosio in acidi grassi. In particolare, utilizzando glucosio e fruttosio marcati, hanno osservato che i carboni marcati ( $^{13}\text{C}$ ) provenienti dal fruttosio erano incorporati nei nuovi acidi grassi, mentre quelli derivanti dal glucosio in quantità molto minore (Fig 1c)

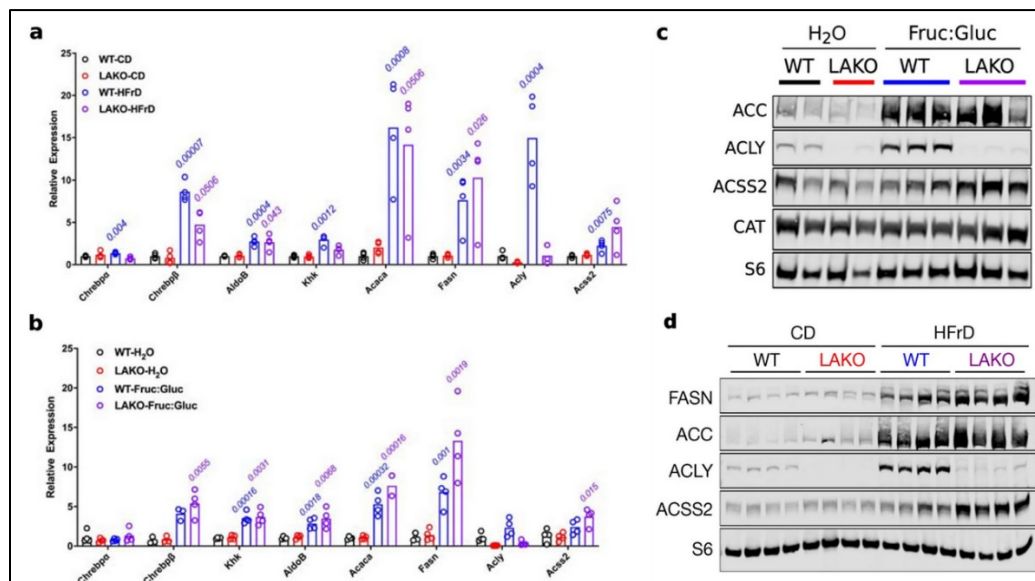


**Figura 1** La sintesi degli acidi grassi indotta dal fruttosio è ACLY-indipendente. **a** Colorazione istologica in ematossilina – eosina e Oil Red O di fegato di topi WT e LAKO, nutriti con una dieta classica (CD) o con una dieta ricca di fruttosio (HFrD) a diversi intervalli di tempo. **b** Incorporazione relativa di deuterio nell'acidi palmitico (16:0) e stearico (18:0) nel fegato di topi nutriti con D<sub>2</sub>O. **c** Percentuale di carboni marcati  $^{13}\text{C}$  negli acidi grassi presenti nel siero di topi nutriti con 1:1 fruttosio:glucosio (ciascuno 1 g kg<sup>-1</sup>).

Questo risultato, a differenza di quelle che erano le informazioni disponibili fino a quel momento, indica come l'utilizzo dei metaboliti del fruttosio non richieda l'azione dell'enzima ACLY.

## L'acetato prodotto dal microbiota alimenta la lipogenesi

In seguito gli autori si sono concentrati nel capire come il fruttosio, e i suoi derivati, venissero utilizzati per la sintesi degli acidi grassi in modo ACLY – indipendente. Dopo un elevato consumo di fruttosio, sia i topi WT che i topi LAKO mostravano una sovra regolazione del fattore di trascrizione ChREBP- $\beta$  e dei suoi geni target (tra cui anche *Acly* nei topi WT, *Acss2*, *AldoB*) (Fig 2a-b). Anche a livello proteico è stata notata una variazione dell'espressione degli enzimi coinvolti nella DNL (Fig 2c-d)



**Figura 2 Il fruttosio indica l'utilizzo dell'acetato per la de novo lipogenesi.** **a** Espressione dell'mRNA di ChREBP e dei suoi geni bersaglio nel fegato di topi WT o LAKO nutriti con una dieta CD o HFrD. **b** Espressione degli mRNA di geni lipogenici nel fegato di topi WT o LAKO a cui è stata somministrata H<sub>2</sub>O o acqua con fruttosio:glucosio per 4 settimane. **c** Western blot di enzimi lipogenici in lisati epatici di topi WT o LAKO, a cui è stata somministrata H<sub>2</sub>O o acqua con fruttosio:glucosio per 4 settimane.

Dopo l'assunzione di fruttosio, negli epatociti dei topi LAKO (privi di ACLY) si osserva un notevole incremento dell'espressione di ACSS2. Coerentemente con questo si osserva un aumento dell'acetilazione degli istoni del locus di *Acss2*. *Acss2* è uno dei locus bersaglio dell'azione sia di ChREBP che di SREBP, entrambi fattori di trascrizione attivati dal consumo di fruttosio. L'insieme di questi dati ha permesso di ipotizzare che ACSS2 possa essere un enzima centrale nella risposta al consumo di fruttosio da parte del fegato. La conversione dell'acetato in acetil – CoA mediata da ACSS2 sostiene la DNL anche in assenza di ACLY, di conseguenza l'acetato, prodotto dal microbiota intestinale, rappresenta un importante substrato per la DNL a seguito dell'assunzione di fruttosio. Sempre tramite tracciamento con isotopi, è stato evidenziato che anche in presenza di ACLY l'acetato esogeno negli epatociti contribuisce al pool di acetil – CoA per la lipogenesi.

Il fruttosio assunto tramite la dieta viene assorbito e degradato negli epatociti secondo una cinetica molto rapida, mentre l'acetil – CoA ha un profilo più lento. Il



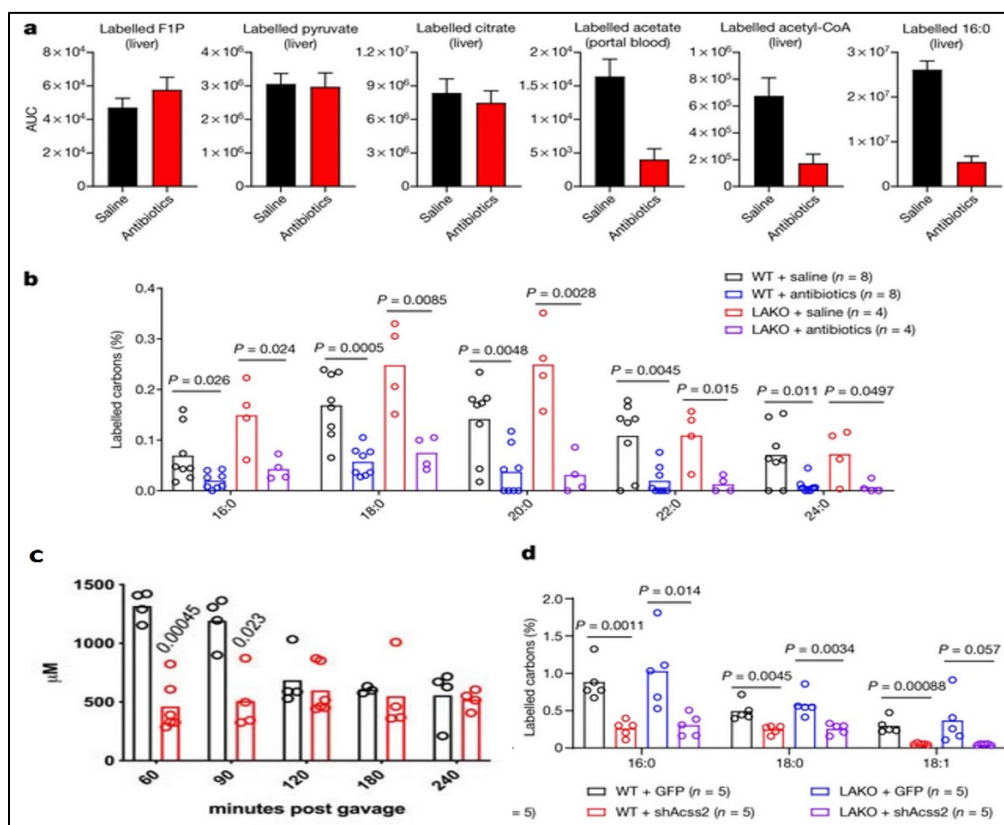
fruttosio che non viene assorbito nell'intestino tenue raggiunge il colon e viene convertito dal microbiota intestinale in acidi grassi a catena corta, soprattutto acetato. Sfruttando un cocktail di antibiotici è stato eliminato il microbiota. L'espressione dei geni pro – DNL non varia a seguito della somministrazione di antibiotici. L'eliminazione del microbiota riduce significativamente la presenza di carboni derivanti dal fruttosio all'interno di acetil – CoA e palmitato nel fegato, e anche negli acidi grassi dei lipidi circolanti (Fig 3a); inoltre la somministrazione di antibiotici riduce anche il livello globale di trigliceridi (Fig 3b). Non varia quella nei primi prodotti del metabolismo del fruttosio (fruttosio-1-fosfato), nel piruvato o nel citrato.

La delezione del microbiota elimina la DNL nel fegato dipendente dal fruttosio, senza andare ad interferire con il metabolismo di quest'ultimo in altri organi o senza alterare l'espressione dei geni caratteristici della de – novo lipogenesi.

L'acetato prodotto dai batteri intestinali è un elemento chiave nel processo di sintesi endogena dei lipidi. La sua concentrazione nel sangue raddoppia dopo l'assunzione di fruttosio, così come avviene per l'acetato contenente i [<sup>13</sup>C] marcati provenienti dal fruttosio. Questo aumento non avviene nei topi trattati con antibiotici, e non si evidenziano particolari fluttuazioni della concentrazione dopo l'assunzione di fruttosio (Fig 3c). Somministrando differenzialmente o *in vivo* acetato marcato o fruttosio marcato (insieme alla bevanda con fruttosio:glucosio in rapporto 1:1) è stato evidenziato che la DNL a partire dall'acetato non era influenzata dall'azione degli antibiotici, mentre invece quella a partire da fruttosio marcato sì.

Successivamente, gli autori silenziato l'enzima ACSS2 nel fegato, per verificare quanto questo fosse importante nel processo di de – novo lipogenesi. La delezione di ACSS2 comporta una drastica diminuzione dei lipidi circolanti sintetizzati a partire da metaboliti del fruttosio (Fig 3d). Il trattamento con antibiotici sopprime completamente la DNL epatica nei topi LAKO. Perciò la de – novo lipogenesi viene bloccata solamente quando viene inibita la produzione di acetil – CoA sia proveniente dall'azione di ACLY che di ACSS2.

L'insieme dei risultati ottenuti suggerisce che esistano due meccanismi indipendenti che regolano la DNL dopo il consumo di fruttosio. Il metabolismo del fruttosio attiva il programma trascrizionale della DNL, mentre la produzione di acetato da parte del microbiota fornisce il principale substrato derivante dal fruttosio che viene usato per la sintesi dei lipidi (dopo all'azione di ACSS2 negli epatociti).



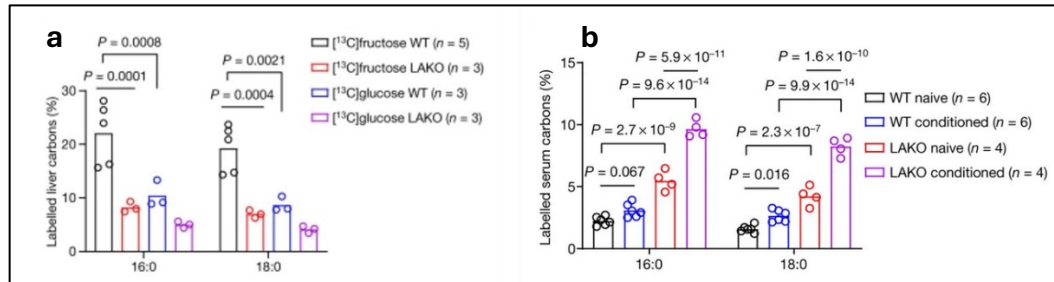
**Figura 3 Il fruttosio alimenta la lipogenesi epatica attraverso il metabolismo del microbiota intestinale. a** Analisi dell'area sotto la curva (AUC) di F1P marcato, piruvato, citrato, acetil-CoA e palmitato (16:0) nel fegato, e acetato nel sangue portale di topi wild-type trattati con soluzione salina o antibiotici, e sottoposti a nutrimento con [13C]fruttosio:glucosio non marcato in rapporto 1:1. **b** Percentuale di carboni totali marcati negli acidi grassi nel siero di topi trattati con soluzione salina o antibiotici e sottoposti a trattamento con 1:1 [13C]fruttosio:glucosio non marcato. **c** Concentrazione di acetato nel sangue (vena porta) dopo il trattamento. Ogni punto dati rappresenta un singolo topo. **d** Percentuale dei carboni totali marcati negli acidi grassi nel siero da 1:1 [13C]fruttosio:glucosio non marcato in topi WT e LAKO una settimana dopo l'iniezione nella vena caudale di AAV8-GFP o AAV8-shAcss2.

### Segnali e substrati lipogenici

La produzione dell'acetato da parte del microbiota intestinale avviene solamente quando il fruttosio alimentare è in quantità tale da non essere assorbito tutto a livello dell'intestino tenue, ma arriva fino al colon, ossia quando l'ingresso supera la capacità di assorbimento intestinale. Infatti, se l'assunzione avviene in maniera graduale, e non in quantità troppo elevata, il maggior contributo alla lipogenesi è dato dai prodotti dell'azione di ACLY, e solo in piccola parte da quelli di ACSS2.

Sono stati nutriti topi con bevande contenenti fruttosio o glucosio marcati [13C]. I carboni derivanti dal fruttosio forniscono un contributo notevole al pool di lipidi epatici: dopo 24 ore dalla somministrazione più del 20% dei carboni degli acidi grassi deriva dal fruttosio. Il contributo del glucosio invece è molto minore. I risultati ottenuti seguono lo stesso andamento sia per topi WT che per i topi LAKO; in quest'ultimi l'assenza di ACLY determina una generale riduzione di carboni marcati presenti all'interno degli acidi grassi, per entrambi gli zuccheri (Fig 4a).

Poiché l'acetato può essere sintetizzato a partire da diverse vie, i topi sono stati nutriti con una bevanda fruttosio:glucosio + acetato [ $^{13}\text{C}$ ]. Il risultato è che nei topi LAKO gli acidi grassi derivanti dall'acetato hanno un tasso maggiore rispetto al livello basale. Se la DNL viene indotta anche dal fruttosio, nei topi WT il contributo dell'acetato aumenta, e nei topi LAKO ciò avviene in modo ancora maggiore (Fig 4b). E questo è associato anche ad un aumento dell'espressione di ACSS2 negli epatociti, soprattutto nei topi LAKO.



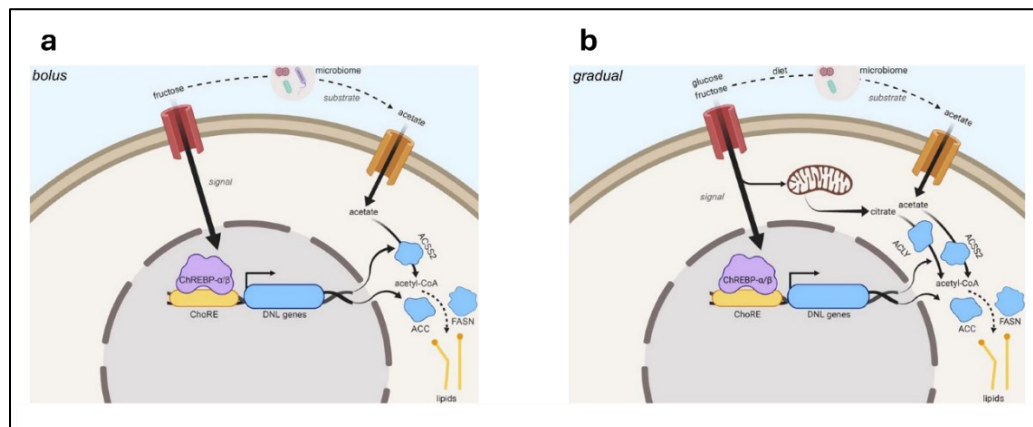
**Figura 4 Il consumo graduale di fruttosio promuove la lipogenesi epatica a partire dall'acetyl-CoA derivato da ACLY e ACSS2. a** Percentuale di carboni totali marcati da [ $^{13}\text{C}$ ]fruttosio o [ $^{13}\text{C}$ ]glucosio negli acidi grassi epatici in topi WT o LAKO. **b** Percentuale di carboni totali marcati da [ $^{13}\text{C}$ ]acetato negli acidi grassi nel siero.

L'espressione del fattore di trascrizione ChREBP- $\beta$  e di altri geni legati alla DNL vengono up-regolati dall'assunzione di fruttosio e glucosio, in tutti i gruppi di topi e in tutte le condizioni, a sostegno del fatto che la loro regolazione è dipendente dal fruttosio, e non dal metabolismo dell'acetyl - CoA.

## Discussione critica

L'articolo analizzato ha dimostrato come il fruttosio alimentare attivi la de-novo lipogenesi nel fegato in modo indipendente dall'azione o dalla presenza del principale enzima responsabile del metabolismo dell'acetil-CoA, ovvero ACLY. In particolare, la DNL nel fegato è dipendente dalla conversione del fruttosio in acetato da parte del microbiota intestinale. L'attivazione del programma trascrizionale della DNL sembra però essere indipendente sia da ACLY che dal microbiota.

Gli autori propongono un nuovo modello per l'induzione della de-novo lipogenesi dipendente dal fruttosio, in particolare i metaboliti del fruttosio nel fegato promuovono il programma trascrizionale della DNL, mentre invece i derivati del metabolismo del fruttosio prodotti dal microbiota, in particolare l'acetato, forniscono il substrato per la sintesi degli acidi grassi (Fig 5a-b). Questo doppio meccanismo spiega perché il fruttosio possiede un potenziale lipogenico molto maggiore rispetto al glucosio, in quanto il glucosio viene quasi completamente assorbito a livello intestinale (anche dopo l'assunzione di elevate quantità), mentre il fruttosio raggiunge il colon, dove il microbiota lo converte in acetato.



**Figura 5 Il fruttosio fornisce sia il segnale che il substrato per promuovere la DNL epatica.** **a** Modello proposto di DNL epatica indotta dal fruttosio. Il catabolismo del fruttosio negli epatociti agisce come segnale per indurre i geni della DNL, tra cui *Accs2*, mentre il metabolismo del fruttosio da parte del microbiota intestinale fornisce acetato come substrato per alimentare la DNL, mediata da *ACSS2*. **b** Modello proposto di DNL epatica graduale indotta dal fruttosio. Come nel modello precedente, il catabolismo del fruttosio negli epatociti agisce come segnale per indurre i geni della DNL. Il catabolismo del fruttosio epatico e del glucosio (ricavato dal fruttosio nell'intestino tenue) fornisce il citrato come substrato per alimentare la DNL, mediata da *ACLY*. Il metabolismo delle fibre e di altri componenti della dieta da parte del microbiota intestinale fornisce acetato come substrato per alimentare la DNL, dopo la sua conversione in acetil-CoA da parte dell'*ACSS2* epatico.

Anche l'acetato prodotto attraverso vie diverse da questa può essere utilizzato nella DNL, rendendo questo processo dipendente dall'azione di *ACLY* solo quando il fruttosio viene assunto in modo graduale (e assorbito nell'intestino). Probabilmente l'acetato da solo non è in grado di attivare la DNL in assenza di un ulteriore segnale (dato dal consumo di uno zucchero). Oltre all'acetato, in quantità minore il microbiota produce anche propionato e butirato. Anche quest'ultimo è coinvolto

nella DNL epatica, probabilmente entrando nel ciclo di Krebs e fornendo quindi altro acetil – CoA citosolico grazie all'azione di ACLY.

Conoscere al meglio le pathway metaboliche coinvolte nella DNL rappresenta un passo fondamentale per prevenire e sviluppare nuove terapie per le malattie metaboliche.

## APPROFONDIMENTO ATTIVITÀ DI STAGE

Negli ultimi decenni, il consumo di fruttosio è aumentato in modo significativo, soprattutto a causa della diffusione di bevande ed alimenti contenenti il dolcificante HFCS. L'aumento globale del consumo di fruttosio rappresenta un problema in quanto associato a diverse patologie, tra cui la già analizzata steatosi epatica, l'obesità, il diabete e l'insulino-resistenza. Oltre alle seguenti patologie, sempre più attenzione si sta ponendo sulla possibile correlazione tra consumo di fruttosio ed aumentata incidenza di tumori, soprattutto per neoplasie del tratto gastro intestinale. Tuttavia, il meccanismo risulta non essere ancora chiaro e questo risulta particolarmente vero per il tumore al pancreas.

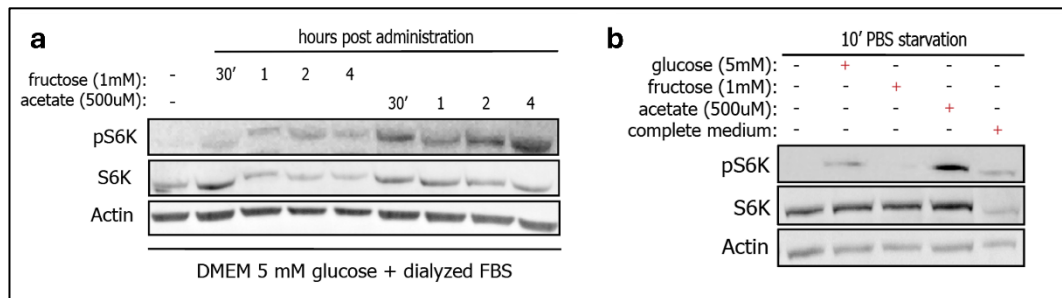
Il tumore del pancreas (PC) è al terzo posto tra i decessi correlati al cancro a causa della diagnosi tardiva e della mancanza di opzioni terapeutiche efficaci. Diversi stili di vita non salutari sono associati a un aumento del rischio di PC, ma il ruolo della dieta, in particolare l'impatto del fruttosio alimentare, non è stato studiato direttamente, nonostante le significative evidenze epidemiologiche che collegano un forte consumo di HFCS a un'elevata incidenza di tumore al pancreas<sup>10</sup>.

Come evidenziato anche nel paper in esame, il fruttosio assunto tramite la dieta alimenta direttamente il pool citoplasmatico di acetil-CoA, tramite la conversione da parte del microbiota intestinale in acetato, che viene poi convertito in acetil-CoA tramite l'enzima ACS2 precedentemente citato. Carrer et al. hanno dimostrato che il metabolismo dell'acetil-CoA supporta direttamente la progressione del tumore al pancreas; l'abbondanza di acetil-CoA è in equilibrio con i livelli globali di acetilazione degli istoni e il suo aumento ha conseguenze importanti sulla struttura della cromatina e sull'espressione genica<sup>9</sup>. Si pensa che la disponibilità di acetil-CoA nel pancreas fluttui in risposta al consumo di fruttosio, influenzando l'acetilazione delle proteine. Evidenze preliminari ottenute nel laboratorio del Dottor Carrer, dove ho svolto il mio stage, mostrano che l'integrazione della dieta con fruttosio influisce sulla tumorigenesi pancreatica, aumentando sia il numero che l'estensione delle lesioni preneoplastiche nei modelli murini. A livello molecolare, il consumo elevato di fruttosio induce significativi cambiamenti nei livelli di espressione di specifiche proteine, analizzati tramite spettrometria di massa, con un aumento dell'espressione di proteine coinvolte nella sintesi proteica.

Nel momento in cui ho iniziato la mia attività di stage presso il laboratorio del Dottor Carrer, ho seguito gli studi condotti dalla Dottoressa Noè Roberta riguardo alla relazione tra il metabolismo del fruttosio (e dei suoi metaboliti, tra cui l'acetato) e l'aumento del rischio dell'insorgenza di cancro al pancreas. Ho potuto partecipare sia ad esperimenti *in vivo*, che *in vitro*, volti a validare e approfondire i dati preliminari ottenuti. In particolare, ho potuto assistere al trattamento dei topi KC (topi esperimenti la mutazione KRAS, Pdx1-Cre LSL-Kras<sup>G12D</sup>; sviluppano in modo spontaneo focolai neoplastici in poche settimane) con bevande ricche di glucosio (usando un controllo con solo acqua, senza zuccheri), per verificare come l'effetto indotto da un elevato consumo di glucosio alimentare si differenzi rispetto a quello

indotto dal fruttosio. Al termine del trattamento i topi vengono sacrificati, si isola il pancreas, lo si inserisce all'interno di una matrice di paraffina, si seziona al microtomo e successivamente si utilizzano le sottili fettine di pancreas così ottenute per effettuare delle analisi istologiche. Tramite colorazione ematossilina – eosina (H&E) si possono osservare gli effetti del trattamento e quindi evidenziare possibili differenze.

Parallelamente, ho potuto seguire, ed in parte eseguire, esperimenti su cellule in coltura per la validazione dei dati ottenuti *in vivo* tramite la spettrometria di massa. Le cellule sono state sottoposte prima ad una starvation di nutrienti (per dieci minuti, in una soluzione salina di PBS), e poi al terreno è stata aggiunto o nulla, o fruttosio, o glucosio o acetato (tutti a concentrazioni fisiologiche) e full medium come controllo positivo. Tale esperimento ha permesso di determinare i livelli della chinasi S6 nel suo stato fosforilato (pS6K) o meno (S6K) (Fig 6b), per valutarne così la sua attivazione. Questo enzima viene fosforilato per attività del complesso mTORC1 (mammalian Target Of Rapamycin Complex 1), che a sua volta ha una attività differente a seconda dei nutrienti che vengono sfruttati dalla cellula ed è uno dei principali effettori e regolatori della sintesi proteica. Dopo il trattamento le cellule sono state lisate, ed è stato effettuato un saggio Wester blot in cui si è potuto osservare che, dopo aver privato le cellule di tutti i nutrienti, l'aggiunta di acetato causa la fosforilazione della chinasi, deducendo così un'aumentata sintesi proteica. (Fig 6b). Quest'ultimo esperimento era stato eseguito in precedenza anche su cellule non sottoposte a starvation, in condizioni fisiologiche (Fig 6a), ottenendo lo stesso risultato.



**Figura 6 Analisi dello stato di attivazione della chinasi S6. a** Western blot di lisati cellulari provenienti da cellule coltivate in un terreno addizionato con fruttosio o acetato. **b** Western blot di lisati cellulari provenienti da cellule sottoposte a starvation e successivamente supplementate con glucosio, fruttosio o acetato nutrienti. Sia nel caso a che nel caso b la proteina normalizzatore è l'actina.





## BIBLIOGRAFIA

- 1) Jensen T, Abdelmalek MF, Sullivan S, Nadeau KJ, Green M, Roncal C, Nakagawa T, Kuwabara M, Sato Y, Kang DH, Tolan DR, Sanchez-Lozada LG, Rosen HR, Lanaspá MA, Diehl AM, Johnson RJ. Fructose and sugar: A major mediator of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2018 May;68(5):1063-1075. doi: 10.1016/j.jhep.2018.01.019. Epub 2018 Feb 2. PMID: 29408694; PMCID: PMC5893377.
- 2) Softic S, Cohen DE, Kahn CR. Role of Dietary Fructose and Hepatic De Novo Lipogenesis in Fatty Liver Disease. *Dig Dis Sci*. 2016 May;61(5):1282-93. doi: 10.1007/s10620-016-4054-0. Epub 2016 Feb 8. PMID: 26856717; PMCID: PMC4838515.
- 3) Hannou SA, Haslam DE, McKeown NM, Herman MA. Fructose metabolism and metabolic disease. *J Clin Invest*. 2018 Feb 1;128(2):545-555. doi: 10.1172/JCI96702. Epub 2018 Feb 1. PMID: 29388924; PMCID: PMC5785258.
- 4) Ter Horst KW, Serlie MJ. Fructose Consumption, Lipogenesis, and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Nutrients*. 2017 Sep 6;9(9):981. doi: 10.3390/nu9090981. PMID: 28878197; PMCID: PMC5622741.
- 5) Zhao S, Torres A, Henry RA, Trefely S, Wallace M, Lee JV, Carrer A, Sengupta A, Campbell SL, Kuo YM, Frey AJ, Meurs N, Viola JM, Blair IA, Weljie AM, Metallo CM, Snyder NW, Andrews AJ, Wellen KE. ATP-Citrate Lyase Controls a Glucose-to-Acetate Metabolic Switch. *Cell Rep*. 2016 Oct 18;17(4):1037-1052. doi: 10.1016/j.celrep.2016.09.069. PMID: 27760311; PMCID: PMC5175409.
- 6) Belew GD, Jones JG. De novo lipogenesis in non-alcoholic fatty liver disease: Quantification with stable isotope tracers. *Eur J Clin Invest*. 2022 Mar;52(3):e13733. doi: 10.1111/eci.13733. Epub 2022 Jan 4. PMID: 34927251.
- 7) Bauermeister A, Mannocho-Russo H, Costa-Lotufó LV, Jarmusch AK, Dorrestein PC. Mass spectrometry-based metabolomics in microbiome investigations. *Nat Rev Microbiol*. 2022 Mar;20(3):143-160. doi: 10.1038/s41579-021-00621-9. Epub 2021 Sep 22. PMID: 34552265; PMCID: PMC9578303.
- 8) Zhao, S., Li, L. (2021). Chemical Isotope Labeling LC-MS for Metabolomics. In: Hu, S. (eds) *Cancer Metabolomics. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 1280. Springer, Charm.
- 9) Carrer A, Trefely S, Zhao S, Campbell SL, Norgard RJ, Schultz KC, Sidoli S, Parris JLD, Affronti HC, Sivanand S, Egolf S, Sela Y, Trizzino M, Gardini A, Garcia BA, Snyder NW, Stanger BZ, Wellen KE. Acetyl-CoA Metabolism Supports Multistep Pancreatic Tumorigenesis. *Cancer Discov*. 2019 Mar;9(3):416-435. doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-0567. Epub 2019 Jan 9. PMID: 30626590; PMCID: PMC6643997.
- 10) Noè R, Carrer A. Diet predisposes to pancreatic cancer through cellular nutrient sensing pathways. *FEBS Lett*. 2024 Jun 17. doi: 10.1002/1873-3468.14959. Epub ahead of print. PMID: 38886112.



# Dietary fructose feeds hepatic lipogenesis via microbiota-derived acetate

<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2101-7>

Received: 1 February 2019

Accepted: 21 January 2020

Published online: 18 March 2020

 Check for updates

Steven Zhao<sup>1,2,3,12</sup>, Cholsoon Jang<sup>4,12</sup>, Joyce Liu<sup>1,2,5</sup>, Kahealani Uehara<sup>5,6,7</sup>, Michael Gilbert<sup>1,2,5</sup>, Luke Izzo<sup>1,2,3</sup>, Xianfeng Zeng<sup>4</sup>, Sophie Trefely<sup>1,2,8</sup>, Sully Fernandez<sup>1,2</sup>, Alessandro Carrer<sup>1,2,11</sup>, Katelyn D. Miller<sup>9</sup>, Zachary T. Schug<sup>9</sup>, Nathaniel W. Snyder<sup>8</sup>, Terence P. Gade<sup>1,10</sup>, Paul M. Titchenell<sup>6,7</sup>, Joshua D. Rabinowitz<sup>4</sup> & Kathryn E. Wellen<sup>1,2,7</sup>✉

Consumption of fructose has risen markedly in recent decades owing to the use of sucrose and high-fructose corn syrup in beverages and processed foods<sup>1</sup>, and this has contributed to increasing rates of obesity and non-alcoholic fatty liver disease<sup>2–4</sup>. Fructose intake triggers de novo lipogenesis in the liver<sup>4–6</sup>, in which carbon precursors of acetyl-CoA are converted into fatty acids. The ATP citrate lyase (ACLY) enzyme cleaves cytosolic citrate to generate acetyl-CoA, and is upregulated after consumption of carbohydrates<sup>7</sup>. Clinical trials are currently pursuing the inhibition of ACLY as a treatment for metabolic diseases<sup>8</sup>. However, the route from dietary fructose to hepatic acetyl-CoA and lipids remains unknown. Here, using in vivo isotope tracing, we show that liver-specific deletion of *Acly* in mice is unable to suppress fructose-induced lipogenesis. Dietary fructose is converted to acetate by the gut microbiota<sup>9</sup>, and this supplies lipogenic acetyl-CoA independently of ACLY<sup>10</sup>. Depletion of the microbiota or silencing of hepatic ACS2, which generates acetyl-CoA from acetate, potently suppresses the conversion of bolus fructose into hepatic acetyl-CoA and fatty acids. When fructose is consumed more gradually to facilitate its absorption in the small intestine, both citrate cleavage in hepatocytes and microorganism-derived acetate contribute to lipogenesis. By contrast, the lipogenic transcriptional program is activated in response to fructose in a manner that is independent of acetyl-CoA metabolism. These data reveal a two-pronged mechanism that regulates hepatic lipogenesis, in which fructolysis within hepatocytes provides a signal to promote the expression of lipogenic genes, and the generation of microbial acetate feeds lipogenic pools of acetyl-CoA.

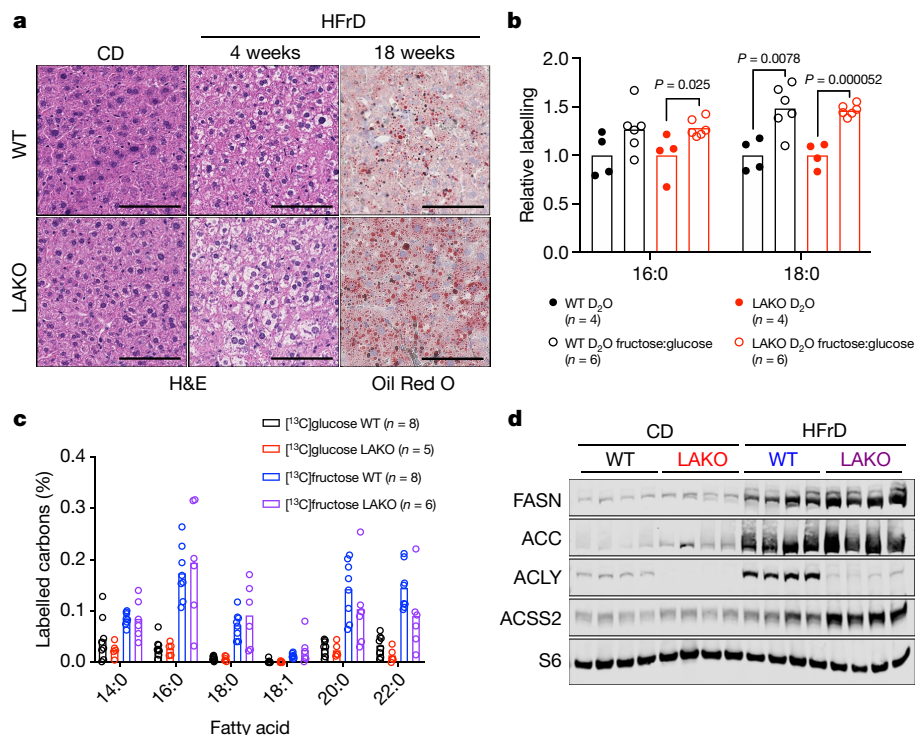
Because ACLY links carbohydrate and lipid metabolism (Extended Data Fig. 1a), we hypothesized that genetic deletion of *Acly* in hepatocytes would protect mice against fructose-induced accumulation of lipids. Although whole-body *Acly* knockout is embryonically lethal<sup>11</sup>, mice with liver-specific *Acly*-knockout (LAKO) were grossly indistinguishable from wild-type littermate controls, with similar body weights and organ sizes between genotypes on a diet of either standard chow or high fructose (60%) (Extended Data Fig. 1b, c). Fructose consumption triggered mild hepatic accumulation of lipids, without fibrosis or excess accumulation of glycogen, in both wild-type and LAKO mice (Fig. 1a, Extended Data Fig. 1d, e). Metabolomic and lipidomic analyses revealed notable diet-dependent changes and relatively modest genotype-dependent differences (Extended Data Figs. 2a, b, 3a–c, Supplementary Tables 1, 2). Consistent with loss of ACLY activity, the

accumulation of citrate and its downstream metabolite aconitate was observed in livers from LAKO mice (Extended Data Fig. 2c). These data demonstrate that ACLY deficiency, unexpectedly, does not markedly affect global levels of hepatic metabolites or prevent fructose-induced accumulation of triglycerides.

## Fructose-driven lipogenesis is ACLY-independent

To further investigate the role of hepatic ACLY in fructose-induced steatosis without altering the overall diet, we fed mice standard chow diets with either normal drinking water or drinking water containing a 1:1 mixture of fructose and glucose (15% each; fructose:glucose) (Extended Data Fig. 4a–c). Similar to mice fed a high-fructose diet, wild-type and LAKO mice drinking fructose:glucose for 4 weeks developed

<sup>1</sup>Department of Cancer Biology, University of Pennsylvania Perelman School of Medicine, Philadelphia, PA, USA. <sup>2</sup>Abramson Family Cancer Research Institute, University of Pennsylvania Perelman School of Medicine, Philadelphia, PA, USA. <sup>3</sup>Cell & Molecular Biology Graduate Group, University of Pennsylvania Perelman School of Medicine, Philadelphia, PA, USA. <sup>4</sup>Department of Chemistry and Lewis-Sigler Institute for Integrative Genomics, Princeton University, Princeton, NJ, USA. <sup>5</sup>Biochemistry & Molecular Biophysics Graduate Group, University of Pennsylvania Perelman School of Medicine, Philadelphia, PA, USA. <sup>6</sup>Department of Physiology, University of Pennsylvania Perelman School of Medicine, Philadelphia, PA, USA. <sup>7</sup>Institute of Diabetes, Obesity and Metabolism, University of Pennsylvania Perelman School of Medicine, Philadelphia, PA, USA. <sup>8</sup>Center for Metabolic Disease Research, Department of Microbiology and Immunology, Temple University Lewis Katz School of Medicine, Philadelphia, PA, USA. <sup>9</sup>Molecular and Cellular Oncogenesis, Wistar Institute, Philadelphia, PA, USA. <sup>10</sup>Department of Radiology, University of Pennsylvania Perelman School of Medicine, Philadelphia, PA, USA. <sup>11</sup>Present address: Veneto Institute of Molecular Medicine (VIMM), Padua, Italy. <sup>12</sup>These authors contributed equally: Steven Zhao, Cholsoon Jang. ✉e-mail: wellenk@upenn.edu



**Fig. 1 | Fructose-dependent fatty acid synthesis is ACly-independent.**

**a**, Representative haematoxylin and eosin (H&E) and Oil Red O histological stains of livers from wild-type (WT) or LAKO mice fed a chow diet (CD) or a high-fructose diet (HFrD) for 4 or 18 weeks. Images are from two independent experiments ( $n = 4$  WT and LAKO mice per diet at 4 weeks; and  $n = 13$  WT and  $n = 6$  LAKO mice per diet at 18 weeks). Scale bars, 100  $\mu\text{m}$ . **b**, Relative deuterium incorporation in saponified palmitic acid (16:0) and stearic acid (18:0) in liver after  $\text{D}_2\text{O}$  labelling of mice for 24 h. The basal level of  $\text{D}_2\text{O}$  labelling is set to

mild hepatic steatosis (Extended Data Fig. 4d). Moreover, deuterated-water ( $\text{D}_2\text{O}$ ) tracing revealed that consumption of fructose:glucose increases hepatic de novo lipogenesis (DNL) to a similar extent in wild-type and LAKO mice (Fig. 1b). Thus, the deletion of *Acly* from liver does not prevent DNL in response to fructose consumption.

Given this unexpected result, we directly tested the effect of ACly deficiency on fructose conversion into nascent fatty acids. Wild-type and LAKO mice were gavaged with 1:1 fructose:glucose, with either glucose or fructose- $^{13}\text{C}$ -labelled (Extended Data Fig. 4e). Notably, fructose carbons were incorporated into fatty acids in LAKO and wild-type mice to a similar extent, whereas glucose carbons were barely used (Fig. 1c, Extended Data Fig. 4f). These data indicate that, in contrast to existing models of fructose metabolism, the use of fructose carbons for hepatic DNL does not require ACly.

### Microbiota-derived acetate feeds lipogenesis

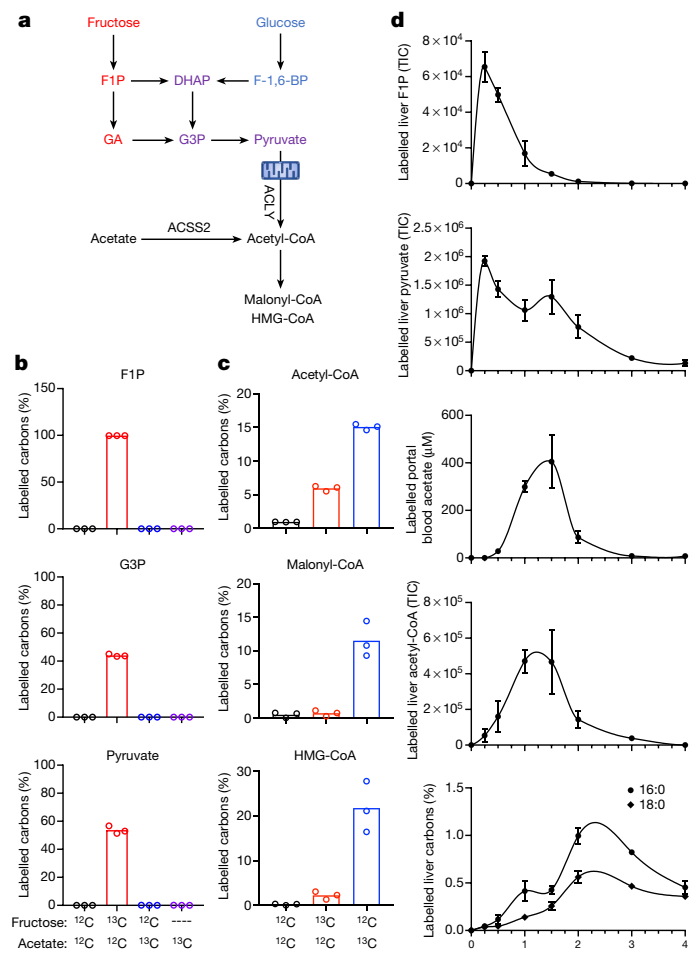
We next investigated the mechanisms of how fructose carbons are used for fatty acid synthesis in an ACly-independent manner. It has been previously shown that the hepatic DNL program is activated in response to carbohydrate consumption by the ChREBP transcription factor<sup>12,13</sup>. After chronic high-fructose consumption, the livers of both wild-type and LAKO mice upregulated the highly active ChREBP- $\beta$  isoform<sup>14</sup>, along with lipogenic genes (*Acaca* and *Fasn*) and other ChREBP target genes, aldolase B (*Aldob*), and ketohexokinase (*Khk*)<sup>15</sup> (Extended Data Fig. 5a, b). Wild-type mice on a high-fructose diet also exhibited upregulation of *Acly* (Extended Data Fig. 5a). The induction of the DNL program was also robust at the protein level (Fig. 1d, Extended Data Fig. 5c). The residual ACly protein in livers from fructose-fed LAKO

1 and compared with  $\text{D}_2\text{O}$  labelling after consumption of fructose:glucose within each genotype. *P* values determined by two-sided *t*-tests. **c**, Percentage of total labelled carbons in saponified fatty acids in serum from mice gavaged with 1:1 fructose:glucose,  $1.0 \text{ g kg}^{-1}$  of each.  $^{13}\text{C}$ -labelled substrates are indicated. Data are mean values. **d**, Western blots of lipogenic enzymes in liver lysates of wild-type or LAKO mice fed a chow or high-fructose diet for 4 weeks. Ribosomal protein S6 was used as a loading control. Data in **c**, **d** are representative of two independent experiments.

mice was detected in cells other than hepatocytes (Extended Data Fig. 5d). Acyl-CoA synthetase short chain family member 2 (ACSS2), which converts acetate into acetyl-CoA, was notably upregulated in fructose-consuming LAKO mice (Fig. 1d, Extended Data Fig. 5b, c). Moreover, the *Acss2* genomic locus showed increased histone H3K27 acetylation after fructose:glucose drinking (Extended Data Fig. 5e). ChREBP binding to the *Acss2* locus was identified in a published chromatin immunoprecipitation with high-throughput sequencing (ChIP-seq) dataset<sup>16</sup> (Extended Data Fig. 5f). *Acss2* is also a target of SREBP transcription factors, which are activated in response to fructose consumption<sup>17-19</sup>. These data suggest that ACSS2 is a component of the hepatic response to fructose consumption.

Because the conversion of acetate to acetyl-CoA by ACSS2 can support DNL in the absence of ACly<sup>10</sup>, we proposed that acetate might be an important source of acetyl-CoA for DNL in the context of fructose feeding (Fig. 2a). Acetate can be generated within mammalian cells by several mechanisms<sup>20-22</sup>, prompting us to investigate whether fructose is converted to acetate in a cell-autonomous manner in hepatocytes. Incubation of mouse hepatocytes with 25 mM [ $^{13}\text{C}$ ]fructose labelled fructolytic intermediates (Fig. 2b), but only minimally labelled acetyl-CoA and malonyl-CoA—the core DNL substrates (Fig. 2c). By contrast, 1 mM [ $^{13}\text{C}$ ]acetate was readily used for the synthesis of acetyl-CoA and malonyl-CoA, as well as HMG-CoA—an intermediate in the mevalonate pathway downstream of acetyl-CoA (Fig. 2c). Therefore, even when ACly is intact, exogenous acetate directly feeds into lipogenic acetyl-CoA pools in hepatocytes.

We thus investigated the possibility that fructose is converted to acetate before reaching the liver to feed hepatic DNL by performing a [ $^{13}\text{C}$ ]fructose isotope-tracing time-course analysis in mice. Oral administration of [ $^{13}\text{C}$ ]fructose labelled both fructose-1-phosphate (F1P) and



**Fig. 2 | Lipogenic acetyl-CoA is preferentially produced from acetate in hepatocytes.** **a**, Pathways for lipogenic acetyl-CoA production from fructose, glucose or acetate. F1P, fructose-1-phosphate; DHAP, dihydroxyacetone phosphate; F-1,6-BP, fructose-1,6-bisphosphate; G3P, glyceraldehyde-3-phosphate; GA, glyceraldehyde. **b**, **c**, Percentage of total labelled carbons in fructolytic intermediates (**b**) and acetyl-CoA, malonyl-CoA or HMG-CoA (**c**) in primary hepatocytes incubated for 6 h with 25 mM fructose plus 1 mM acetate. <sup>13</sup>C-labelled substrates are indicated. Data are mean values. *n* = 3 plates of cells, analysed in parallel. **d**, Total ion counts (TIC) of labelled F1P, pyruvate and acetyl-CoA in liver, concentrations of labelled acetate in the portal blood, and the percentage labelling of saponified palmitic acid (16:0) and stearic acid (18:0) in liver of saline-treated wild-type mice gavaged with 1:1 [<sup>13</sup>C]fructose: unlabelled glucose. Data are mean ± s.e.m. (*n* = 3 mice per time point).

pyruvate in the liver, with peaks between 15 and 30 min after gavage, which indicates rapid absorption of fructose and hepatic fructolysis (Fig. 2d). Hepatic labelling of acetyl-CoA was much slower, peaking at 60–90 min (Fig. 2d). The slower kinetics of acetyl-CoA labelling was closely aligned with the appearance of labelled acetate in the portal circulation (Fig. 2d). Labelling of hepatic fatty acids followed that of acetyl-CoA, peaking at 120–180 min (Fig. 2d), consistent with fructose feeding resulting in the indirect production of hepatic acetyl-CoA and fatty acids via acetate.

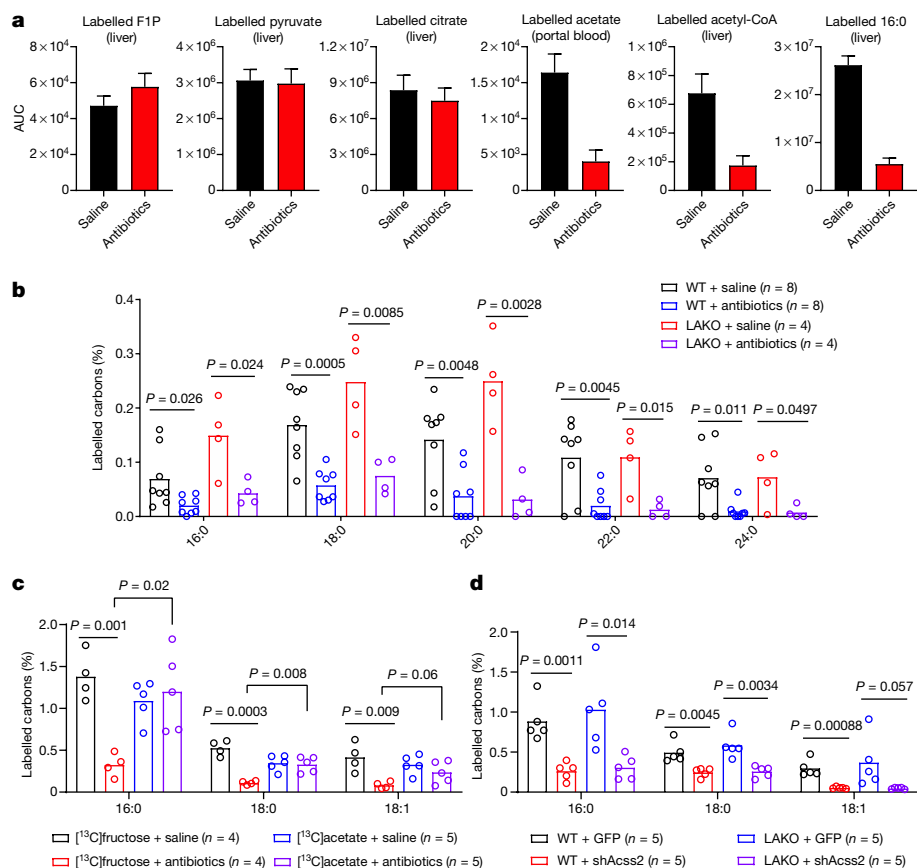
We next sought to determine the source of fructose-derived acetate. Although fructose is mainly taken up by the small intestine, unabsorbed fructose reaches the colon where the microbiota converts it into short-chain fatty acids, including acetate<sup>9</sup>. To test whether the microbiota is important for hepatic DNL, we depleted it with an antibiotic cocktail (Extended Data Fig. 6a–d). Antibiotic treatment slightly enhanced the appearance of labelled fructose and fructose-derived glucose in the portal vein after oral administration of [<sup>13</sup>C]fructose

(Extended Data Fig. 6e, f). The induction of hepatic DNL genes after fructose consumption is thought to be dependent on fructolytic and/or glycolytic intermediates<sup>12,23</sup>. Consistent with the normal passage of fructose from the intestine to the liver, DNL gene expression remained intact after antibiotic treatment (Extended Data Fig. 6g), as did the labelling of F1P, pyruvate and citrate in the liver (Fig. 3a, Extended Data Fig. 7a). By contrast, microbiome depletion markedly reduced the labelling from [<sup>13</sup>C]fructose of hepatic acetyl-CoA and palmitate, as well as fatty acids within circulating lipids (Fig. 3a, b, Extended Data Fig. 7a, b). This reduction was well matched with depleted portal and caecal labelling of acetate and other short-chain fatty acids (Fig. 3a, Extended Data Figs. 7a, 8a, b). Antibiotic treatment also reduced levels of total hepatic triglycerides (Extended Data Fig. 8c), consistent with previous observations<sup>24,25</sup>. Thus, depletion of microbiota suppresses hepatic DNL from [<sup>13</sup>C]fructose, without impairing fructose metabolism in the small intestine or liver, or the induction of DNL gene expression.

We next investigated whether acetate is a key microbial product supporting DNL. To assess whether fructose intake led to an appreciable increase in concentrations of portal acetate, we measured acetate in portal and systemic serum after gavage. Acetate concentrations in the portal vein increased approximately twofold compared with the baseline (to more than 1 mM) at 60–90 min after fructose gavage (Extended Data Fig. 8d), corresponding to acetate labelling from fructose (Fig. 2d). The rise in portal acetate was absent in antibiotic-treated mice (Extended Data Fig. 8d). Acetate concentrations in the systemic circulation were lower than that in the portal vein and did not markedly fluctuate after fructose consumption, which suggests clearance by the liver (Extended Data Fig. 8d). Next, to assess whether acetate supports DNL downstream of microbial metabolism, mice were gavaged with [<sup>13</sup>C]acetate, along with 1:1 fructose:glucose. DNL from [<sup>13</sup>C]acetate, in contrast to that from [<sup>13</sup>C]fructose, was not affected by antibiotic treatment (Fig. 3c). Finally, to test whether hepatic ACSS2 is required for fructose to feed DNL, ACSS2 in the liver was silenced using an adeno-associated viral (AAV) hairpin targeting *Acss2*<sup>26</sup> (Extended Data Fig. 8e–g). Depletion of hepatic ACSS2 strongly suppressed the labelling of fatty acids in circulating lipids from [<sup>13</sup>C]fructose (Fig. 3d). Together, these data point to a two-pronged mechanism of DNL after consumption of a fructose bolus, in which sugar metabolism in hepatocytes triggers the DNL transcriptional program, but microbiome-dependent acetate production serves as the major fructose-derived lipogenic substrate, after conversion to acetyl-CoA by hepatic ACSS2 (Extended Data Fig. 10a).

### Distinct lipogenic signal and substrates

Microbiota-dependent acetate production from fructose occurs when the rate of ingestion exceeds the uptake capacity of the small intestine<sup>9</sup>. Thus, if fructose is consumed gradually, its contribution to DNL might occur to a greater extent via ACLY, and to a lesser extent via microbial acetate production. Still, after providing fructose:glucose in the drinking water, DNL was comparably stimulated in the presence or absence of ACLY (Fig. 1b). To explore this further, mice were given <sup>13</sup>C-labelled fructose or glucose in drinking water for 24 h (Fig. 4a). Fructose-derived carbons provided a substantial contribution to hepatic lipid pools, with greater than 20% of total liver fatty acid carbons being labelled by [<sup>13</sup>C]fructose after 24 h of fructose:glucose drinking, whereas [<sup>13</sup>C]glucose contributed less (Fig. 4b). In this context, ACLY deficiency reduced [<sup>13</sup>C]fructose and [<sup>13</sup>C]glucose labelling of fatty acids (Fig. 4b). Nevertheless, total DNL as measured by D<sub>2</sub>O labelling was not different between genotypes (Fig. 4c), indicating sufficient availability of other two-carbon donors. We hypothesized that acetate from other sources (for example, fibre fermentation) might be assimilated. To test this, we supplemented fructose:glucose drinking water with [<sup>13</sup>C]acetate at initial exposure and after 2 weeks on fructose:glucose water (Extended Data Fig. 9a). The labelling of fatty acids from [<sup>13</sup>C]acetate was higher in LAKO mice at baseline (Fig. 4d). After



**Fig. 3 | Metabolism of bolus fructose by the microbiota feeds hepatic lipogenesis.** **a**, Area under curve ( $\text{AUC}_{0-240 \text{ min}}$ ) analysis of labelled F1P, pyruvate, citrate, acetate and saponified palmitate (16:0) in liver and acetate in portal blood from wild-type mice treated with saline or antibiotics and gavaged with 1:1  $[^{13}\text{C}]$ fructose:unlabelled glucose. Data are mean  $\pm$  s.e.m. See Extended Data Fig. 7a for curves. **b**, Percentage of total labelled carbons in saponified fatty acids in serum from mice treated with saline or antibiotics and gavaged with 1:1  $[^{13}\text{C}]$ fructose:unlabelled glucose. *P* values determined by two-sided *t*-tests.

**c**, Percentage of total labelled carbons in saponified fatty acids in serum from LAKO mice treated with saline or antibiotics and gavaged with 1:1 fructose:glucose plus 0.5 g  $\text{kg}^{-1}$  acetate.  $^{13}\text{C}$ -labelled substrates are indicated. *P* values determined by two-sided *t*-tests. **d**, Percentage of total labelled carbons in saponified fatty acids in serum from 1:1  $[^{13}\text{C}]$ fructose:unlabelled glucose in wild-type and LAKO mice 1 week after tail vein injection with AAV8-GFP or AAV8-shAcsc2. *P* values determined by two-sided *t*-tests. Data in **b-d** denote mean values.

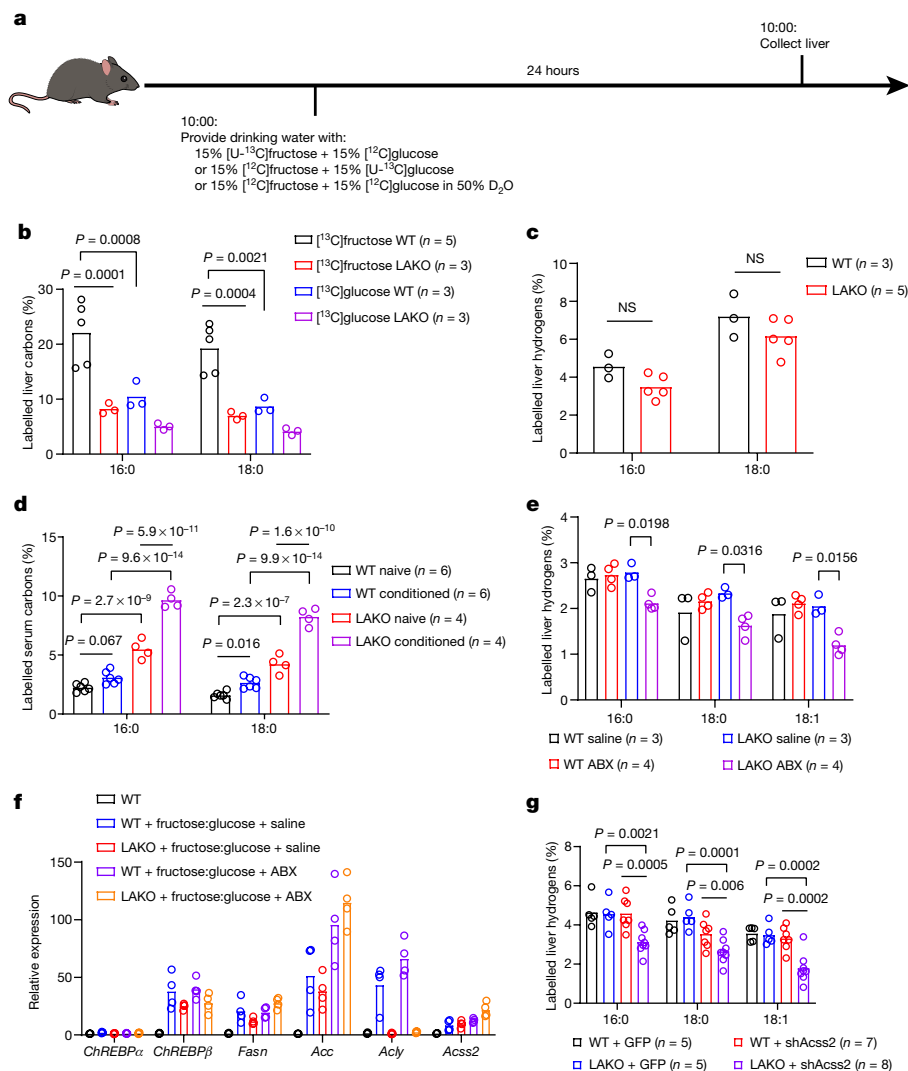
fructose conditioning, the contribution of acetate to DNL increased in wild-type mice, and this was further enhanced in LAKO mice (Fig. 4d), consistent with increased hepatic ACSS2 expression in LAKO mice after fructose feeding, which preceded the onset of steatosis (Extended Data Fig. 9b, c). We next assessed the contribution of microbiome-derived acetate from all dietary sources in the context of gradual fructose consumption. Antibiotic treatment suppressed total hepatic DNL in LAKO mice (Fig. 4e, Extended Data Fig. 9d). ChREBP- $\beta$  and DNL gene expression were confirmed to be upregulated by fructose:glucose drinking in all groups, indicating that their regulation in response to fructose consumption is independent of acetyl-CoA metabolism (Fig. 4f). Finally, we examined DNL in mice given fructose:glucose after the silencing of hepatic ACSS2, and found that in the context of gradual fructose consumption via drinking water, the loss of both ACLY and ACSS2 is necessary to suppress DNL (Fig. 4g). These data indicate that when fructose is consumed gradually to facilitate its absorption in the small intestine, the rate of DNL is established by signalling mechanisms (that is, sugar-driven activation of ChREBP), and DNL is suppressed only when acetyl-CoA production by both ACLY and ACSS2 is inhibited (Extended Data Fig. 10b).

## Discussion

This study demonstrates that bolus fructose consumption triggers hepatic DNL that is independent of liver ACLY but dependent on the

metabolism of fructose by the gut microbiota to acetate, which then reaches the liver via the portal vein. The induction of the DNL transcriptional program in the liver, however, seems to be independent of both ACLY and the microbiome, consistent with evidence that hexose phosphate metabolites are important for ChREBP activation<sup>19,27</sup>. This may explain why *Khk*-knockout mice are protected from fructose-induced fatty liver<sup>28,29</sup>. Thus, we propose a revised model of fructose-dependent DNL induction, in which hepatic fructose metabolism provides a signal to promote DNL transcriptionally while microbial fructose metabolism provides acetate to feed DNL (Extended Data Fig. 10a). These dual mechanisms may also explain the higher lipogenic potential of fructose as compared to glucose<sup>30</sup>, at least in the context of high-dose sugar consumption, in that the small intestine rapidly absorbs even large loads of glucose, whereas fructose reaches the gut microbiota, which generate acetate<sup>9</sup>. When consumed more gradually, fructose can feed DNL in an ACLY-dependent manner. However, acetate from other sources is also readily available to the liver, rendering ACLY dispensable for DNL even when fructose is gradually consumed (Extended Data Fig. 10b). Of note, acetate is probably insufficient to trigger an increase in DNL in the absence of the sugar-derived lipogenic signal. Thus, it will be important to define how fructose interacts with dietary sources of acetate such as ethanol and fermentable fibres.

Understanding the fundamental pathways involved in hepatic DNL is important for the development of therapeutic interventions



**Fig. 4 | Gradual consumption of fructose promotes hepatic lipogenesis from ACLY- and ACSS2-derived acetyl-CoA.** **a**, Experimental design for gradual fructose consumption. [<sup>13</sup>C] denotes uniformly labelled <sup>13</sup>C. **b**, Percentage of total labelled carbons from [<sup>13</sup>C]fructose or [<sup>13</sup>C]glucose in saponified hepatic fatty acids from wild-type or LAKO mice. **c**, Percentage of total labelled hydrogens from D<sub>2</sub>O in saponified hepatic fatty acids. **d**, Percentage of total labelled carbons from [<sup>13</sup>C]acetate in saponified fatty acids in serum. See Extended Data Fig. 9a for experimental design. **e**, Percentage of total labelled

hydrogens from D<sub>2</sub>O in saponified hepatic fatty acids from wild-type and LAKO mice after treatment with saline or antibiotics (ABX) for 1 week. **f**, mRNA expression of *ChREBP* (also known as *Mlx1pl*) and lipogenic genes in the livers of mice in **e**. **g**, Percentage of total hydrogens labelled in saponified hepatic fatty acids from wild-type and LAKO mice 1 week after injection with AAV8-GFP or AAV8-shAcss2. Data in **b–g** denote mean values. All *P* values determined by two-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey’s test for multiple comparisons.

for metabolic diseases. In addition to acetate, the microbiome also produces other short-chain fatty acids such as butyrate and propionate. Butyrate has been shown to contribute to hepatic lipogenesis<sup>31</sup>, presumably by first entering the mitochondrial TCA cycle and then feeding extra-mitochondrial pools of acetyl-CoA in an ACLY-dependent manner<sup>32</sup>. Diet and microbiome could potentially affect the efficacy of ACLY inhibitors, which are currently in clinical trials for hypercholesterolaemia<sup>33</sup>. Previous studies of RNA-interference-mediated ACLY deficiency report decreased hepatic lipids in *db/db* mice and mice fed a high-fat, high-sucrose diet, but increased hepatic lipids in mice fed a high-fat diet only<sup>34–36</sup>. In our own data, principal component analysis of hepatic triglycerides separated LAKO mice from wild-type mice on a high-fructose but not a chow diet (Extended Data Fig. 3c), supporting the notion that ACLY may have distinct roles depending on diet. The current data determine a previously unappreciated interaction between diet, the gut microbiome, and host organ metabolism that contributes to fructose-induced non-alcoholic fatty liver disease.

### Online content

Any methods, additional references, Nature Research reporting summaries, source data, extended data, supplementary information, acknowledgements, peer review information; details of author contributions and competing interests; and statements of data and code availability are available at <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2101-7>.

- Bray, G. A., Nielsen, S. J. & Popkin, B. M. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Am. J. Clin. Nutr.* **79**, 537–543 (2004).
- Jensen, T. et al. Fructose and sugar: A major mediator of non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* **68**, 1063–1075 (2018).
- Hannou, S. A., Haslam, D. E., McKeown, N. M. & Herman, M. A. Fructose metabolism and metabolic disease. *J. Clin. Invest.* **128**, 545–555 (2018).
- Softic, S., Cohen, D. E. & Kahn, C. R. Role of dietary fructose and hepatic de novo lipogenesis in fatty liver disease. *Dig. Dis. Sci.* **61**, 1282–1293 (2016).
- Lambert, J. E., Ramos-Roman, M. A., Browning, J. D. & Parks, E. J. Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* **146**, 726–735 (2014).
- Donnelly, K. L. et al. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Invest.* **115**, 1343–1351 (2005).

7. Fukuda, H., Katsurada, A. & Iritani, N. Effects of nutrients and hormones on gene expression of ATP citrate-lyase in rat liver. *Eur. J. Biochem.* **209**, 217–222 (1992).
8. Pinkosky, S. L., Groot, P. H. E., Lalwani, N. D. & Steinberg, G. R. Targeting ATP-Citrate Lyase in Hyperlipidemia and Metabolic Disorders. *Trends Mol. Med.* **23**, 1047–1063 (2017).
9. Jang, C. et al. The small intestine converts dietary fructose into glucose and organic acids. *Cell Metab.* **27**, 351–361.e3 (2018).
10. Zhao, S. et al. ATP-citrate lyase controls a glucose-to-acetate metabolic switch. *Cell Rep.* **17**, 1037–1052 (2016).
11. Beigneux, A. P. et al. ATP-citrate lyase deficiency in the mouse. *J. Biol. Chem.* **279**, 9557–9564 (2004).
12. Herman, M. A. & Samuel, V. T. The sweet path to metabolic demise: fructose and lipid synthesis. *Trends Endocrinol. Metab.* **27**, 719–730 (2016).
13. Uyeda, K. & Repa, J. J. Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis. *Cell Metab.* **4**, 107–110 (2006).
14. Herman, M. A. et al. A novel ChREBP isoform in adipose tissue regulates systemic glucose metabolism. *Nature* **484**, 333–338 (2012).
15. Iizuka, K. The role of carbohydrate response element binding protein in intestinal and hepatic fructose metabolism. *Nutrients* **9**, 181 (2017).
16. Pongvarin, N. et al. Genome-wide analysis of ChREBP binding sites on male mouse liver and white adipose chromatin. *Endocrinology* **156**, 1982–1994 (2015).
17. Luong, A., Hannah, V. C., Brown, M. S. & Goldstein, J. L. Molecular characterization of human acetyl-CoA synthetase, an enzyme regulated by sterol regulatory element-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **275**, 26458–26466 (2000).
18. Ikeda, Y. et al. Transcriptional regulation of the murine acetyl-CoA synthetase 1 gene through multiple clustered binding sites for sterol regulatory element-binding proteins and a single neighboring site for Sp1. *J. Biol. Chem.* **276**, 34259–34269 (2001).
19. Softic, S. et al. Divergent effects of glucose and fructose on hepatic lipogenesis and insulin signaling. *J. Clin. Invest.* **127**, 4059–4074 (2017).
20. Liu, X. et al. Acetate production from glucose and coupling to mitochondrial metabolism in mammals. *Cell* **175**, 502–513.e13 (2018).
21. Bulusu, V. et al. Acetate recapturing by nuclear acetyl-coa synthetase 2 prevents loss of histone acetylation during oxygen and serum limitation. *Cell Rep.* **18**, 647–658 (2017).
22. Lu, M. et al. ACO12-dependent alteration of acetyl-coa drives hepatocellular carcinoma metastasis by epigenetic induction of epithelial-mesenchymal transition. *Cell Metab.* **29**, 886–900.e5 (2019).
23. Ter Horst, K. W. & Serlie, M. J. Fructose consumption, lipogenesis, and non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrients* **9**, 981 (2017).
24. Bergheim, I. et al. Antibiotics protect against fructose-induced hepatic lipid accumulation in mice: role of endotoxin. *J. Hepatol.* **48**, 983–992 (2008).
25. Kaden-Volynets, V. et al. Lack of liver steatosis in germ-free mice following hypercaloric diets. *Eur. J. Nutr.* **58**, 1933–1945 (2019).
26. Mews, P. et al. Acetyl-CoA synthetase regulates histone acetylation and hippocampal memory. *Nature* **546**, 381–386 (2017).
27. Li, M. V. et al. Glucose-6-phosphate mediates activation of the carbohydrate responsive binding protein (ChREBP). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **395**, 395–400 (2010).
28. Lanaspá, M. A. et al. Ketohehexokinase C blockade ameliorates fructose-induced metabolic dysfunction in fructose-sensitive mice. *J. Clin. Invest.* **128**, 2226–2238 (2018).
29. Ishimoto, T. et al. Opposing effects of fructokinase C and A isoforms on fructose-induced metabolic syndrome in mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109**, 4320–4325 (2012).
30. Parks, E. J., Skokan, L. E., Timlin, M. T. & Dingfelder, C. S. Dietary sugars stimulate fatty acid synthesis in adults. *J. Nutr.* **138**, 1039–1046 (2008).
31. den Besten, G. et al. Gut-derived short-chain fatty acids are vividly assimilated into host carbohydrates and lipids. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **305**, G900–G910 (2013).
32. Donohoe, D. R. et al. The Warburg effect dictates the mechanism of butyrate-mediated histone acetylation and cell proliferation. *Mol. Cell* **48**, 612–626 (2012).
33. Ziegelbaum, N. K., Yandrapalli, S., Nabors, C. & Frishman, W. H. Bempedoic acid (ETC-1002): ATP citrate lyase inhibitor: review of a first-in-class medication with potential benefit in statin-refractory cases. *Cardiol. Rev.* **27**, 49–56 (2019).
34. Guo, L. et al. Enhanced acetylation of ATP-citrate lyase promotes the progression of nonalcoholic fatty liver disease. *J. Biol. Chem.* **294**, 11805–11816 (2019).
35. Wang, Q. et al. Abrogation of hepatic ATP-citrate lyase protects against fatty liver and ameliorates hyperglycemia in leptin receptor-deficient mice. *Hepatology* **49**, 1166–1175 (2009).
36. Wang, Q. et al. Deficiency in hepatic ATP-citrate lyase affects VLDL-triglyceride mobilization and liver fatty acid composition in mice. *J. Lipid Res.* **51**, 2516–2526 (2010).

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

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Limited 2020



# Article

## Methods

### Data reporting

No statistical methods were used to predetermine sample size. The experiments were not randomized and investigators were not blinded to allocation during experiments and outcome assessment.

### Generation of LAKO mice

Generation of *Acly*<sup>fl/fl</sup> mice on a C57Bl6/J background was previously described<sup>10</sup>. To generate hepatocyte-specific *Acly* knockouts, *Acly*<sup>fl/fl</sup> mice were crossed to albumin-Cre transgenic mice (B6.Cg<sup>Tg(Alb-cre)21Mgn/J</sup>, Jackson Laboratory)<sup>37</sup>.

### Genotyping

Genotyping of the recombined *Acly* allele was confirmed as previously described<sup>10</sup>. Genotyping of the *Alb-cre* allele was confirmed with the following primer sequences: *Alb-cre-5'F* (CCTGCCAGCATGGATATAA), *Alb-cre-3'R* (GTTGTCTTTGTGCTGCTGA), *Alb-TSP3* (GAAGCAGAAGCT-TAGGAAGATGG), and the following cycling conditions: 1 cycle at 94 °C for 5 min; 35 cycles at 94 °C for 45 s, 58 °C for 45 s, 72 °C for 1 min; and 1 cycle at 72 °C for 10 min; hold at 4 °C.

### Mouse studies

All animal protocols in this study were approved by the University of Pennsylvania's Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) and Princeton University's IACUC. For diet studies, 4-week-old male mice were placed on either a regular chow diet (Lab Diet 5010) or a high-fructose chow diet (Teklad TD.89247) for indicated lengths of time. Weights of mice kept on each diet were taken weekly. For drinking-water studies, mice were provided with regular tap water (filtered through a 0.22- $\mu$ m filter) or 15% (w/v) fructose:15% (w/v) glucose (Sigma F3510, G8270) in tap water (filtered through a 0.22- $\mu$ m filter). Daily water consumption was determined by measuring the total consumption in a cage, divided by the number of mice in the cage. To deplete the gut microbiome, mice were given a daily 10  $\mu$ l g<sup>-1</sup> body weight oral gavage consisting of 1 mg ml<sup>-1</sup> ampicillin, 1 mg ml<sup>-1</sup> gentamicin, 0.5 mg ml<sup>-1</sup> vancomycin, 1 mg ml<sup>-1</sup> neomycin, 1 mg ml<sup>-1</sup> metronidazole in a 0.9% NaCl solution for 7–10 days. Studies were controlled to mice given the same 0.9% NaCl solution without antibiotics. To knockdown *Acss2*, 6–8-week-old male mice were injected via tail-vein with  $2.0 \times 10^{11}$  genome copies per mouse of AAV8.U6.shAcss2.CMV.eGFP.SV40 (University of Pennsylvania Vector Core) or AAV8.CMV.PI.eGFP.WPRE.bGH (Addgene) as a control; experiments were performed 1 week after injection.

### Histology

For H&E, Periodic Acid Schiff and trichrome staining: tissues were fixed in formalin overnight, dehydrated by titrating in ethanol (50%, 75% and 95%), and submitted to the Molecular Pathology and Imaging Core at the University of Pennsylvania for paraffin embedding, sectioning and staining. For Oil Red O staining: tissues were fixed in formalin overnight, dehydrated by titrating in sucrose (10%, 20% and 30%), and embedded in Richard-Allan Scientific NEG-50 frozen section medium (ThermoFisher Scientific, 6502) by freezing in 2-methylbutane that was cooled using dry ice. Tissues frozen in NEG-50 were submitted to the Molecular Pathology and Imaging Core at the University of Pennsylvania for cryosectioning and staining. Images were acquired on a Keyence BZ-X710 microscope.

### Bacterial quantification

Caecal contents were collected, snap-frozen and weighed before storage at -80 °C until use. DNA was extracted from caecal contents using a Fecal DNA extraction kit (IBI Scientific, IB47821) according to manufacturer's instructions. Samples were diluted 1:1,000 before use for reverse transcription PCR (RT-PCR). To establish a bacterial DNA standard, genomic DNA was extracted from Stbl3 *E. coli* cells. A

standard curve was generated using a 1:4 serial dilution starting with 10 ng of *E. coli* DNA. RT-PCR was performed as described, using previously published universal *I6S* primers (forward: 5'-TCCTACGGGAGGC AGCAGT-3', reverse: 5'-GGACTACCAGGTATCTAATCTGTT-3')<sup>38</sup>. Relative bacterial load was calculated by normalizing DNA content to initial caecal content weight.

### Western blotting

Protein extraction from tissue was performed by re-suspending frozen tissue in 0.5 ml of RIPA buffer (1% NP-40, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 50 mM Tris plus protease and phosphatase inhibitors), and lysed using a tissue lyser (Qiagen) twice for 30 s at 20 Hz. After lysis, samples were incubated on ice for 10 min, then spun down at 15,000g for 5 min at 4 °C. Supernatant was collected and stored in -80 °C until immunoblotting. Antibodies used in this study were: ACYL (Proteintech, 15421-1-AP), ACS2 (Cell Signaling Technology, 3658S), acetyl-CoA carboxylase (Cell Signaling Technology, 3676S), fatty acid synthase (Cell Signaling Technology 3189S), catalase (Cell Signaling Technology, 14097S), ribosomal protein S6 (Cell Signaling Technology 2217S), and IRDye800CW goat anti-rabbit (LI-COR 926-32211). Immunoblots were developed using a LI-COR Odyssey Clx.

### RT-qPCR

RNA extraction from tissue was performed by re-suspending frozen tissue in 1 ml Trizol (Life Technologies), and lysed using a tissue lyser (Qiagen) for 60 s at 30 Hz, followed by manufacturer protocol for Trizol RNA extraction. cDNA was synthesized using high-capacity RNA-to-cDNA master mix (Applied Biosystems, 4368814), as per the kit instructions. cDNA was diluted 1:20 and amplified using PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, A25778) on the ViiA-7 Real-Time PCR system. Fold change in expression was calculated using  $\Delta\Delta C_t$ , with the *18S* reference gene as an endogenous control. Primer sequences for RT-qPCR are: *Aldob* (forward: GAAACCGCTGCAAAGGATAA, reverse: GAGGCTCTCGTGGAAAAGGAT), *Khk* (forward: ATGTGGTGGCAAATACCCAGA, reverse: CAAGCAAGGAAAGGACAGTGC), *Acly* (forward: TTCGTCAAACAGCACTTCC, reverse: ATTTGGCTTCTTGGAGGTG), *Acss2* (forward: GCTTCTTTCCATTCTTCGGT, reverse: CCCGGA CTCATTACAGGATTG), *ChREBPa* (forward: CGACACTCACCCACCTCTTC, reverse: TTGTTCAGCCGATCTTGTC), *ChREBPb* (forward: TCTGCAGATCGCGTGGAG, reverse: CTTGTCCCGGCATAGCAAC), *Fasn* (forward: ATGGTGGTGTGGACATGGTC, reverse: CCCAGCCTTCCATCTCCTG), *Acc1* (forward: ACAGTGGAGCTAGAATTGGAC, reverse: ACTTCCCGACCA AGGACTTTG).

### Measurement of DNL using isotope tracers

To assess total lipogenesis, mice were provided with 50% (v/v) deuterated water (Sigma 151882) mixed into 15% fructose:15% glucose (w/v) drinking water for 24 h. Systemic blood was collected by cardiac puncture, allowed to coagulate on ice for 15 min, and spun down at 15,000g for 10 min at 4 °C to collect serum. To account for differences in drinking water consumption, calculated deuterium enrichment labelling in serum water was used to normalize labelling into fatty acids. To assess lipogenesis from dietary carbohydrates, on the day of experiment, mice were weighed and fasted from 10:00 until 15:00, when they were given an oral gavage consisting of a 1:1 mixture of glucose and fructose in 0.9% NaCl saline. Doses used in this study ranged from 1.0 g kg<sup>-1</sup> or 2.0 g kg<sup>-1</sup> of each hexose. [<sup>13</sup>C]glucose (Cambridge Isotope Laboratories, CLM-1396-1) or [<sup>13</sup>C]fructose (Cambridge Isotope Laboratories, CLM-1553-1) were provided with the corresponding unlabelled hexose. Six hours after gavage, systemic blood was collected by tail bleeding the mice and incubating the blood on ice for 15 min before spinning down at 15,000g for 10 min at 4 °C to collect serum. To assess lipogenesis from dietary acetate, this procedure was repeated, but with an oral gavage containing 2.0 g kg<sup>-1</sup> of unlabelled glucose and fructose with 0.5 g kg<sup>-1</sup> [1,2-<sup>13</sup>C]acetate

(Cambridge Isotope Laboratories, CLM-440-1). To assess lipogenesis from dietary carbohydrates in drinking water, [ $U$ - $^{13}C$ ]glucose or [ $U$ - $^{13}C$ ]fructose were provided with the corresponding unlabeled hexose at 15% (w/v) in drinking water for 24 h. To assess lipogenesis from dietary acetate in drinking water, 150 mM [ $1,2$ - $^{13}C$ ]acetate was added to 15% fructose:15% glucose (w/v) for 24 h. Tissues were collected using a clamp pre-cooled with liquid nitrogen. The frozen liver samples were ground at liquid nitrogen temperature with a Cryomill (Retsch). Saponification of lipids and liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS) analysis were performed as previously described<sup>39</sup>. In brief, serum (5  $\mu$ l) or liver powder (10 mg) was incubated with 1 ml of 0.3 M KOH in 90% methanol at 80 °C for 1 h in a 2 ml glass vial. Formic acid (0.1 ml) was then added for neutralization. The saponified fatty acids were extracted by adding 0.5 ml of hexane, vortexing, and transferring the top hexane layer to a new glass vial. Samples were then dried under a stream of nitrogen gas and dissolved in 100  $\mu$ l (for serum) or 1 ml (for liver) of isopropanol:methanol (1:1; v/v) solution for LC–MS analysis. Separation was performed by reversed-phase ion-pairing chromatography on a C8 column coupled to negative-ion mode, full-scan LC–MS at 1-Hz scan time and 100,000 resolving power (stand-alone orbitrap; Thermo Fischer Scientific). Data analysis with MAVEN software and natural isotope correction were performed as previously described<sup>40</sup>.

### Primary hepatocyte isolation

Hepatocytes were isolated using a two-step collagenase and DNase digestion protocol<sup>41</sup> and plated in M199 media containing 5 mM glucose, 10% FBS, 500 nM dexamethasone and 1 nM insulin. After attachment, cells were changed to M199 media containing 5 mM glucose, 500 nM dexamethasone and incubated overnight. Cells were switched to M199 containing 5 mM glucose, 10% FBS, 500 nM dexamethasone, 100 nM insulin and respective fructose and acetate supplementation for 6 h on the day of experiment. Evidence that high concentrations of glucose are required to induce the DNL gene program in primary hepatocytes<sup>42</sup> informed our use of 25 mM fructose.

### Acyl-CoA measurements in primary hepatocytes

Measurements of Acyl-CoA in primary hepatocytes were performed by LC–MS/high-resolution mass spectrometry as previously described<sup>43</sup>. In brief, primary hepatocytes were isolated and cultured in 6-well plates as described in ‘Primary hepatocyte isolation’. At collection, culture medium was completely aspirated before collecting cells in 0.5 ml ice-cold 10% trichloroacetic acid per well of a 6-well dish using a cell lifter. Samples were then sonicated for 10  $\times$  0.5 s pulses to completely disrupt cellular membranes, and incubated on ice to precipitate proteins. Protein was pelleted at 16,000g for 10 min at 4 °C. Supernatant was collected and purified by solid-phase extraction using Oasis HLB 1cc (30 mg) SPE columns (Waters). Eluate was evaporated to dryness under nitrogen gas and re-suspended in 50  $\mu$ l of 5% 5-sulfosalicylic acid (w/v) for injection. Samples were analysed by an Ultimate 3000 autosampler coupled to a Thermo Q-Exactive Plus instrument in positive electrospray ionization (ESI) mode. For isotopic tracer analysis, isotopic enrichment from [ $U$ - $^{13}C$ ]fructose (Cambridge Isotope Laboratories, CLM-1553) or [ $U$ - $^{13}C$ ]acetate (Cambridge Isotope Laboratories, CLM-440-1) was calculated to compensate for the nonlinearity of isotopic enrichment using the FluxFix calculator<sup>44</sup>.

### Fructolytic measurements in primary hepatocytes

For fructolytic intermediate measurements in primary hepatocytes, culture medium was completely aspirated before collecting cells in 0.5 ml of cold 80:20 methanol:water per well of a 6-well dish using a cell lifter. Samples were then sonicated for 10  $\times$  0.5-s pulses to completely disrupt cellular membranes, and incubated on ice. Samples were then spun down at 16,000g for 10 min at 4 °C. Supernatant was collected and dried under nitrogen gas flow in preparation for water-soluble metabolomic analysis.

### ChIP–qPCR

For H3K27ac ChIP–qPCR studies, wild-type male mice were provided with fructose:glucose drinking water for 24 h, and orally gavaged with 2.0 g kg<sup>-1</sup> fructose plus 2.0 g kg<sup>-1</sup> glucose 1 h before being euthanized. ChIP was performed as previously described<sup>45</sup> with adjustments to start from liver tissue. Liver tissues were obtained from mice 90 min after gavage, and 100 mg of tissue was weighed. Tissues were homogenized by mincing briefly with razor blades followed by resuspension in 5 ml of ice-cold PBS and several passages through a 16-gauge syringe needle into 15-ml conical tubes. Samples were crosslinked with 2% formaldehyde for 10 min at room temperature. The reactions were quenched with 0.25 M glycine. The cells were then washed with PBS and resuspended in cell lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.1, 10 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5% NP-40), supplemented with protease inhibitors (Roche). The cell pellet was resuspended in 0.5 ml of nuclear lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.1, 5 mM EDTA, 1% SDS) supplemented with protease inhibitors. The chromatin was fragmented with a Diagenode Bioruptor Pico (12 cycles of 30 s on followed by 30 s off, at 4 °C). Samples were incubated with protein G magnetic beads (Millipore-Sigma, 16-662) and H3K27ac (Abcam, ab4729) or normal rabbit IgG (Cell Signalling Technology, 2729S) antibody overnight at 4 °C. The next day, samples were washed five times with decreasingly stringent buffers. ChIP DNA was eluted off the beads by incubating beads in 125  $\mu$ l elution buffer for 10 min at 65 °C. The combined supernatant was then incubated overnight at 65 °C to reverse crosslinks and treated with proteinase K for 1 h the next morning. Samples were purified using Macherey-Nagel DNA purification kit, with NTB binding buffer. Samples were diluted 1:5 in nuclease-free water before RT–qPCR reactions, which were performed as described above with the following primers: *Mlxipl* p1 (forward: CGCACCCGGTCTACAGTTT, reverse: GTGCCTCTCTCCTT AGC), *Mlxipl* p2 (forward: GCCATCCACGTGCTAAGGA, reverse: GGCTTTTACTGCTGGGTGTGG), *Pklr* p1 (forward: GGGAGGATGCCCA CTACAG, reverse: TTGGAAGCCTTGACTACTGGG), *Pklr* p2 (forward: CCCAGTGACAAGGCTCCAT, reverse: CTCTGCCTTTGTCAGTGGGA), *Acss2* p1 (forward: ATTGGATGCCTAGACACGG, reverse: CGCATCAAGT TCCGAACACC), *Acss2* p2 (forward: TCAGGACAGTTTAGGGTGCAA, Reverse: TTACAAAGACCTGCCTCTGCC).

### Triglyceride measurements

Triglyceride measurements were performed using a Triglyceride Colorimetric Assay Kit (Cayman Chemical, 10010303) as per manufacturer’s instructions.

### Metabolomics

Water-soluble metabolite extraction was performed as previously described<sup>9</sup>. For serum samples, 100  $\mu$ l of methanol at –20 °C was added to 5  $\mu$ l of serum sample and incubated on ice for 10 min, followed by vortexing and centrifugation at 16,000g for 10 min at 4 °C. The supernatant (first extract) was transferred to a new tube. Then, 50  $\mu$ l methanol was added to resuspend the pellet, followed by vortexing and centrifugation at 16,000g for 10 min at 4 °C. The supernatant (second extract) was combined with the first extract. Then, 3  $\mu$ l of the 150  $\mu$ l extract was loaded to LC–MS. For tissue samples, frozen tissue samples were ground at liquid nitrogen temperature with a Cryomill (Retsch). The resulting tissue powder was weighed (approximately 20 mg). The extraction was then done by adding –20 °C 40:40:20 methanol:acetonitrile:water to the powder and incubating at –20 °C overnight, followed by vortexing and centrifugation at 16,000g for 10 min at 4 °C. The volume of the extraction solution ( $\mu$ l) was 40  $\times$  the weight of tissue (mg) to make an extract of 25 mg tissue per millilitre solvent. Serum and tissue extracts were analysed by LC–MS, using two different LC–MS methods chosen for optimal separation of glucose and fructose (in serum) and of hexose phosphate species (from tissues). Serum extracts were analysed (without drying) using a quadrupole-orbitrap mass spectrometer (Q Exactive, Thermo Fisher Scientific)

# Article

operating in negative ion mode, coupled to hydrophilic interaction chromatography via electrospray ionization and used to scan from  $m/z$  70 to 1000 at 1 Hz and 75,000 resolution. Liquid chromatography separation was on a XBridge BEH Amide column (2.1 mm  $\times$  150 mm, 2.5  $\mu$ m particle size, 130 Å pore size) using a gradient of solvent A (20 mM ammonium acetate, 20 mM ammonium hydroxide in 95:5 water: acetonitrile, pH 9.45) and solvent B (acetonitrile). Flow rate was 150  $\mu$ l min<sup>-1</sup>. The liquid chromatography gradient was: 0 min, 85% B; 2 min, 85% B; 3 min, 80% B; 5 min, 80% B; 6 min, 75% B; 7 min, 75% B; 8 min, 70% B; 9 min, 70% B; 10 min, 50% B; 12 min, 50% B; 13 min, 25% B; 16 min, 25% B; 18 min, 0% B; 23 min, 0% B; 24 min, 85% B; 30 min, 85% B. Autosampler temperature was 5 °C, and injection volume was 3  $\mu$ l. Tissue extracts were dried under nitrogen gas flow and re-dissolved in LC-MS grade water. Metabolites were analysed via reverse-phase ion-pairing chromatography coupled to an Exactive Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific). The mass spectrometer was operated in negative ion mode with resolving power of 100,000 at  $m/z$  200 and scan range of  $m/z$  75–1000. The liquid chromatography method was modified from an earlier method<sup>46</sup>, using an Atlantis T3 column (150 mm  $\times$  2.1 mm, 3  $\mu$ m particle size, 100 Å pore size), with a gradient of solvent A (97:3 water:methanol with 10 mM tributylamine and 15 mM acetic acid) and solvent B (methanol). The liquid chromatography gradient was 0 min, 0% B, 200  $\mu$ l min<sup>-1</sup>; 2 min, 0% B, 200  $\mu$ l min<sup>-1</sup>; 4 min, 20% B, 200  $\mu$ l min<sup>-1</sup>; 13 min, 80% B, 200  $\mu$ l min<sup>-1</sup>; 17 min, 100% B, 200  $\mu$ l min<sup>-1</sup>; 17.5 min, 100% B, 300  $\mu$ l min<sup>-1</sup>; 20 min, 100% B, 300  $\mu$ l min<sup>-1</sup>; 20.5 min, 0% B, 300  $\mu$ l min<sup>-1</sup>; 24 min, 0% B, 300  $\mu$ l min<sup>-1</sup>; 25 min, 0% B, 200  $\mu$ l min<sup>-1</sup>. Other liquid chromatography parameters, common to both methods, were column temperature 25 °C, autosampler temperature 5 °C, and injection volume 10  $\mu$ l. Data analysis with MAVEN software and natural isotope correction was performed as previously described<sup>40</sup>. Volcano plot and principle component analysis of metabolomics data were generated using Metaboanalyst<sup>47</sup>.

## Acetate measurement

Acetate was derivatized and measured by LC-MS. The derivatization mixture was 12 mM EDC, 15 mM 3-nitrophenylhydrazine and pyridine (2% v/v) in methanol. The reaction was stopped with quenching reagent consisting of 0.5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol in water. Serum (5  $\mu$ l) was mixed with derivatizing reagent (100  $\mu$ l) and incubated for 1 h at 4 °C. Then, the samples were centrifuged at 16,000g for 10 min at 4 °C, and 20  $\mu$ l of supernatant was mixed with 200  $\mu$ l of the quenching reagent. After centrifugation at 16,000g for 10 min at 4 °C, supernatants were collected for LC-MS analysis. A quadrupole-time-of-flight mass spectrometer (Agilent 6550 iFunnel Q-TOF) operating in negative ion mode was coupled to C18 chromatography via electrospray ionization and used to scan from  $m/z$  100 to 300 at 1 Hz and 15,000 resolution. Liquid chromatography separation was on an Acquity UPLC BEH C18 column (2.1 mm  $\times$  100 mm, 1.75  $\mu$ m particle size, 130 Å pore size; Waters) using a gradient of solvent A (water) and solvent B (methanol). Flow rate was 200  $\mu$ l min<sup>-1</sup>. The liquid chromatography gradient was: 0 min, 10% B; 1 min, 10% B; 5 min, 30% B; 7 min, 100% B; 11 min, 100% B; 11.5 min, 10% B; 14 min, 10% B. Autosampler temperature was 5 °C, column temperature was 60 °C, and injection volume was 10  $\mu$ l. Ion masses for derivatized acetate were 194.

## Lipidomics

Lipidomics was performed as previously described<sup>48</sup>, with some modifications on an extraction step. In brief, liver powder (10 mg) was dissolved in 100  $\mu$ l of isopropanol. After centrifugation at 14,000g at 4 °C for 10 min, supernatant was transferred to a glass mass spectrometry vial and injected into a 1290 Infinity UHPLC system coupled to the Q-TOF mass spectrometer (the same instrument as used for acetate measurement). To cover both the positive charged and negative charged species, each sample was analysed twice using the same liquid chromatography gradient but with different mass spectrometer ionization modes. The liquid chromatography separation was performed on an Agilent Poroshell 120 EC-C18 column (150  $\times$  2.1 mm, 2.7  $\mu$ m particle

size) with a flow rate of 150  $\mu$ l min<sup>-1</sup>. Solvent A was 1 mM ammonium acetate plus 0.2% acetic acid in water/methanol (90:10). Solvent B was 1 mM ammonium acetate plus 0.2% acetic acid in methanol/2-propanol (2:98). The solvent gradient in volume ratios was as follows: 0–2 min, 25% B; 2–4 min, 25 to 65% B; 4–16 min, 65 to 100% B; 16–20 min, 100% B; 20–21 min, 100 to 25% B; 21–27 min, 25% B. Principle component analysis was generated using Metaboanalyst<sup>47</sup> (<https://www.metaboanalyst.ca>) and a heat map of lipidomics data was generated using Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus>).

## Reporting summary

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

## Data availability

All data generated or analysed during this study are included in this published article (and its Supplementary Information files). Source Data for Figs. 1–4 and Extended Data Figs. 1, 4–9 are provided with the paper.

- Postic, C. et al. Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic beta cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase. *J. Biol. Chem.* **274**, 305–315 (1999).
- Nadkarni, M. A., Martin, F. E., Jacques, N. A. & Hunter, N. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology* **148**, 257–266 (2002).
- Guan, D. et al. Diet-induced circadian enhancer remodeling synchronizes opposing hepatic lipid metabolic processes. *Cell* **174**, 831–842.e12 (2018).
- Su, X., Lu, W. & Rabinowitz, J. D. Metabolite Spectral Accuracy on Orbitraps. *Anal. Chem.* **89**, 5940–5948 (2017).
- Titchenell, P. M., Chu, Q., Monks, B. R. & Birnbaum, M. J. Hepatic insulin signalling is dispensable for suppression of glucose output by insulin in vivo. *Nat. Commun.* **6**, 7078 (2015).
- Iroz, A. et al. A specific ChREBP and PPAR $\alpha$  cross-talk is required for the glucose-mediated FGF21 response. *Cell Rep.* **21**, 403–416 (2017).
- Frey, A. J. et al. LC-quadrupole/Orbitrap high-resolution mass spectrometry enables stable isotope-resolved simultaneous quantification and <sup>13</sup>C-isotopic labeling of acyl-coenzyme A thioesters. *Anal. Bioanal. Chem.* **408**, 3651–3658 (2016).
- Trefely, S., Ashwell, P. & Snyder, N. W. FluxFix: automatic isotopologue normalization for metabolic tracer analysis. *BMC Bioinformatics* **17**, 485 (2016).
- Lee, J. V. et al. Acetyl-CoA promotes glioblastoma cell adhesion and migration through Ca<sup>2+</sup>-NFAT signaling. *Genes Dev.* **32**, 497–511 (2018).
- Lu, W. et al. Metabolomic analysis via reversed-phase ion-pairing liquid chromatography coupled to a stand alone orbitrap mass spectrometer. *Anal. Chem.* **82**, 3212–3221 (2018).
- Chong, J. et al. MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic Acids Res.* **46** (W1), W486–W494 (2018).
- Neinast, M. D. et al. Quantitative analysis of the whole-body metabolic fate of branched-chain amino acids. *Cell Metab.* **29**, 417–429.e4 (2018).

**Acknowledgements** This work was supported by grants R01CA174761, R01CA228339 and R01DK116005 to K.E.W. S.Z. is supported by pre-doctoral fellowship F99CA222741. C.J. is supported by the American Diabetes Association through post-doctoral fellowship 1-17-PDF-076. K.U. is supported by NIAMS training grant T32AR053461. L.I. is supported by NIGMS training grant T32GM07229. S.T. is supported by the American Diabetes Association through post-doctoral fellowship 1-18-PDF-144. S.F. is supported through the Penn-PORT IRACDA grant K12 GM081259. P.M.T. is supported by K01DK111715. N.W.S. is supported by the NIH grant R03HD092630 and R01GM132261. J.D.R. is supported by the NIH Pioneer Award 1DP1DK113643 and Diabetes Research Center P30 DK019525. We thank S. Berger and P. Mews for providing the AAV.U6.shAcsc2.CMV.eGFP.SV40 vector. We thank G. Wu and Y. Saimon for discussions on the microbiome.

**Author contributions** The project was conceptualized and designed by S.Z., C.J. and K.E.W. K.E.W. and J.D.R. guided the study. S.Z. generated LAKO mice and performed most of the mouse experiments, with help from J.L., S.F., A.C. and K.D.M. C.J. performed mouse experiments and most of the LC-MS analyses with help from X.Z. for LC-MS analysis of short-chain fatty acid species. S.T. and N.W.S. performed LC-MS analysis of acyl-CoA species. K.U. isolated and performed experiments on primary hepatocytes. J.L., M.G. and L.I. performed experiments. P.M.T., Z.T.S. and T.P.G. provided guidance on study design. S.Z. prepared figures with input from C.J., J.D.R. and K.E.W. S.Z., C.J. and K.E.W. wrote and edited the manuscript, with input from J.D.R. All authors read and provided feedback on manuscript and figures.

**Competing interests** J.D.R. is a consultant to Pfizer and to Colorado Research Partners. All other authors declare no conflicts of interest.

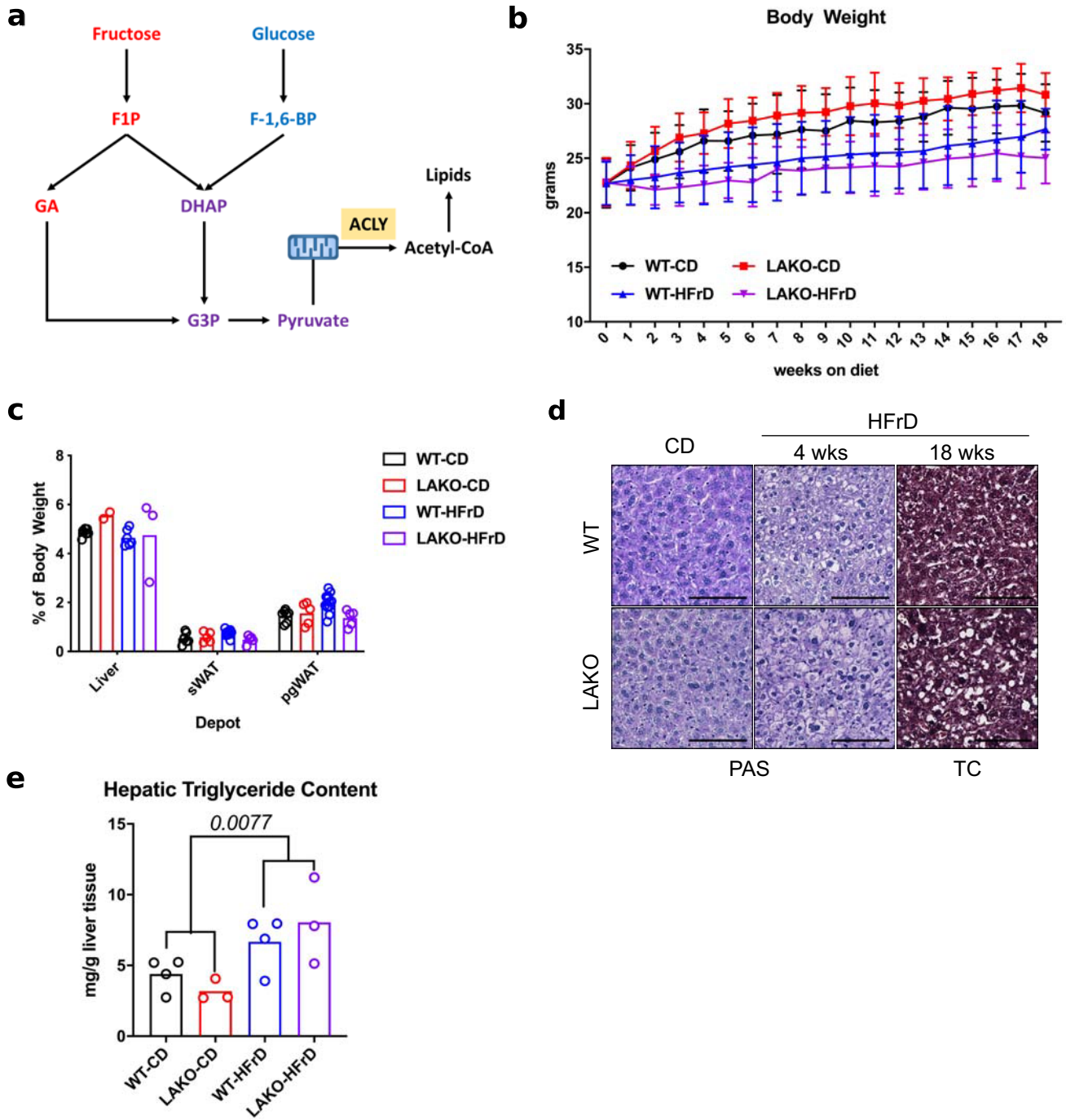
## Additional information

**Supplementary information** is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2101-7>.

**Correspondence and requests for materials** should be addressed to K.E.W.

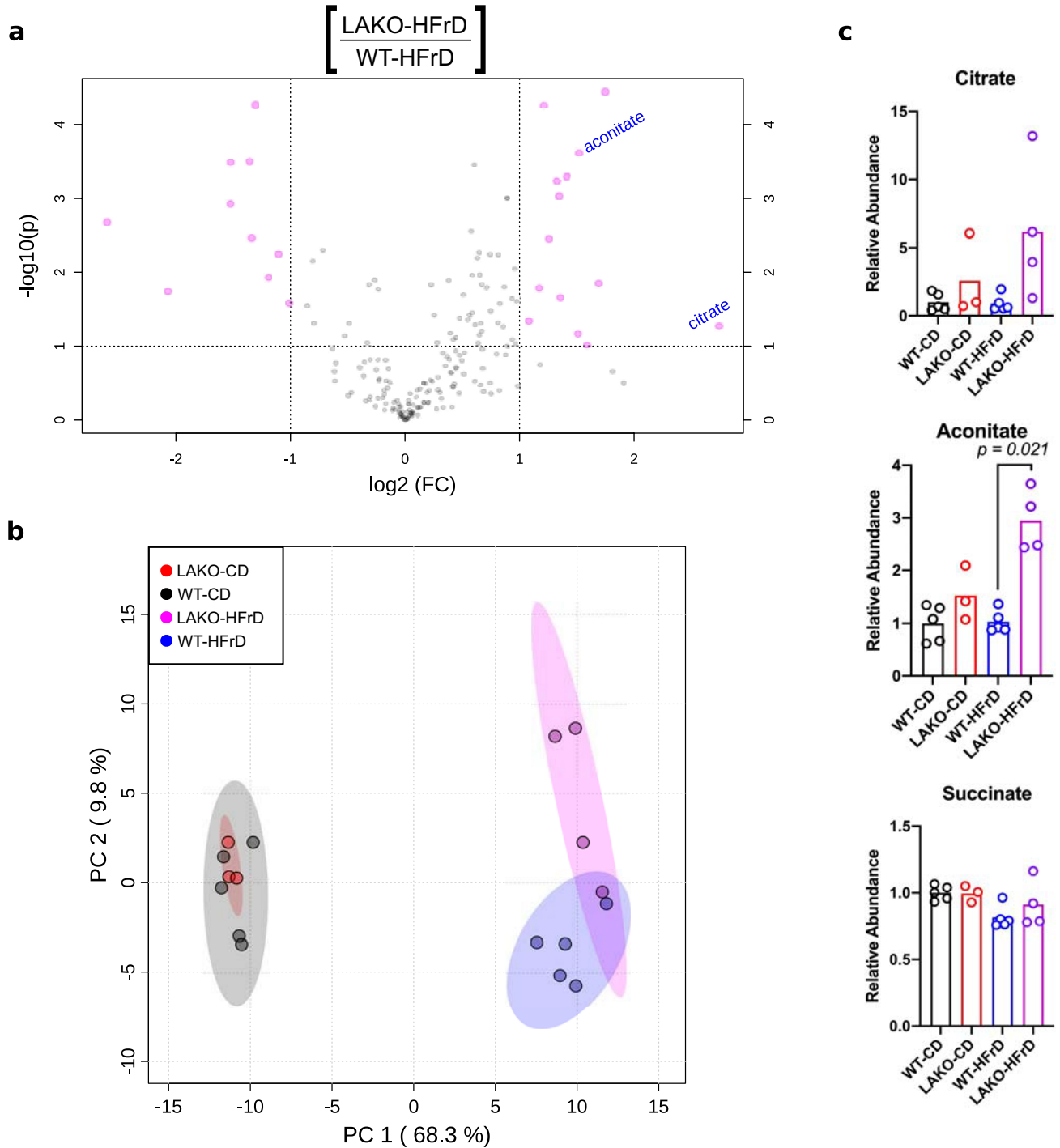
**Peer review information** Nature thanks D. Wade Abbott, Navdeep Chandel, Catherine Postic and the other, anonymous, reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work.

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



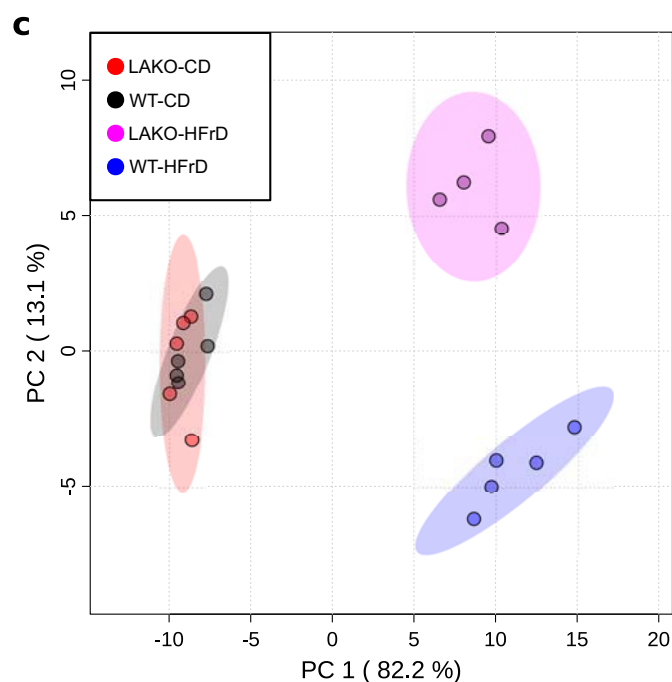
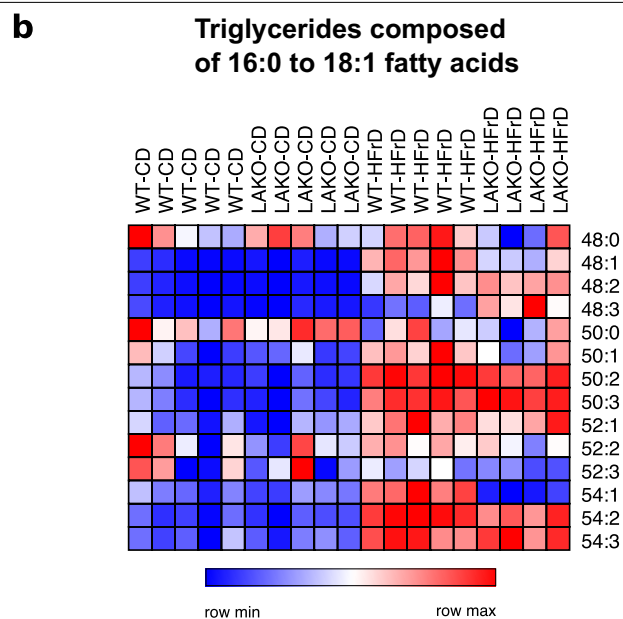
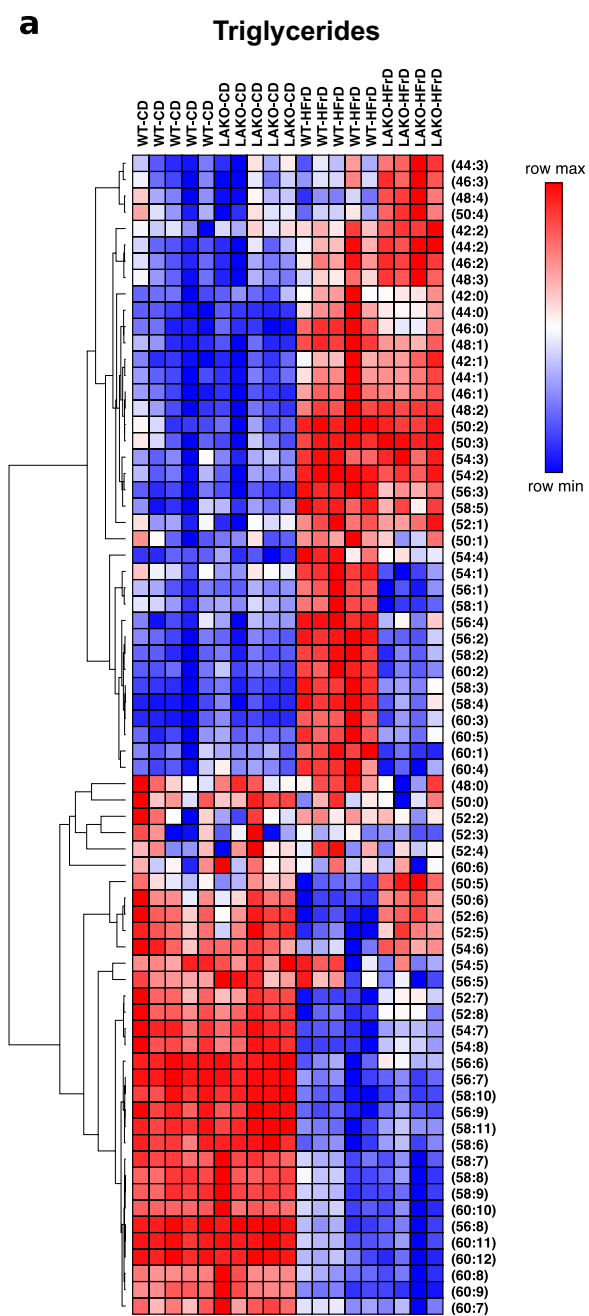
**Extended Data Fig. 1 | Hepatic ACLY deficiency minimally affects the response to dietary fructose.** **a**, Schematic of fructolysis and glycolysis feeding into de novo lipogenesis. **b**, Body weights of wild-type and LAKO mice fed a chow diet (CD) or high-fructose diet (HFrD) for 18 weeks ( $n = 13$  WT-CD;  $n = 5$  LAKO-CD;  $n = 14$  WT-HFrD; and  $n = 5$  LAKO-HFrD mice). Data are mean  $\pm$  s.d. **c**, Weights of liver, posterior subcutaneous white adipose tissue (sWAT) and perigonadal adipose tissue (pgWAT) in wild-type and LAKO mice on a chow diet or HFrD for 18 weeks (liver/sWAT/pgWAT:  $n = 7/7/7$  WT-CD;  $n = 2/5/5$  LAKO-CD;

$n = 6/12/12$  WT-HFrD; and  $n = 3/5/5$  LAKO-HFrD). **d**, Representative histology images of Periodic acid–Schiff (PAS) stain for glycogen and trichrome (TC) for fibrosis in livers from wild-type or LAKO mice on a HFrD. Scale bars, 100  $\mu$ m. Images are representative of two mice per group in one experiment. **e**, Triglyceride content in wild-type or LAKO mice on a chow diet or HFrD for 18 weeks ( $n = 4$  WT-CD;  $n = 3$  LAKO-CD;  $n = 3$  WT-HFrD;  $n = 4$  LAKO-HFrD).  $P$  values determined by Welch's  $t$ -test. Data in **c** and **e** denote mean values.



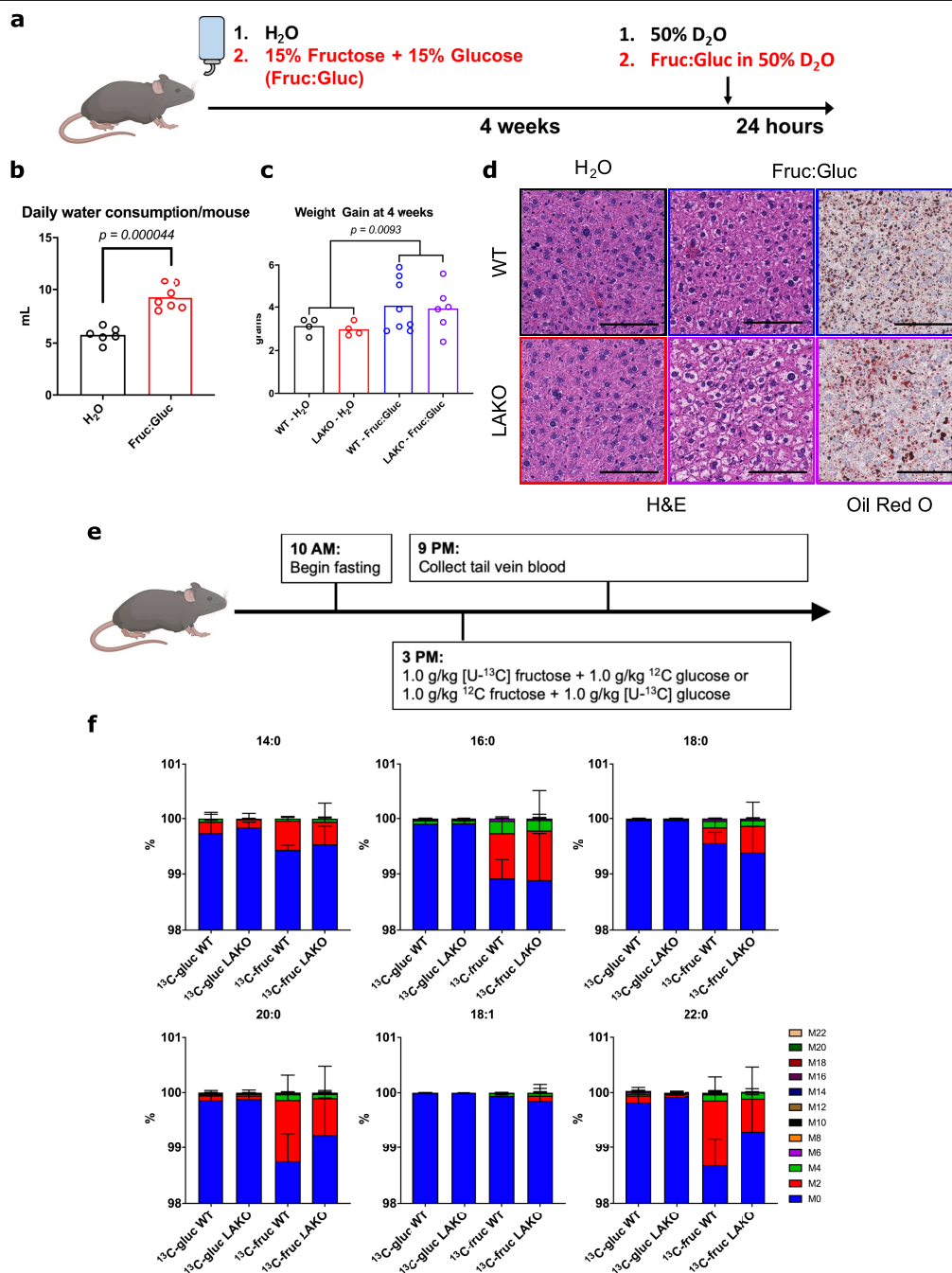
**Extended Data Fig. 2 | Hepatic ACLY deficiency results in modest metabolic alterations on a high-fructose diet.** **a**, Volcano plot of hepatic metabolites in wild-type or LAKO mice on a chow (CD) or high-fructose diet (HFrD) for 4 weeks. Pink dots indicate significant hits as determined by a fold-change (FC) threshold of 2.0, and *P*-value threshold of 0.1, assuming equal variance. **b**, Principle component (PC) analysis of log-transformed data in

Supplementary Table 1. Each dot represents a unique sample; coloured shading denotes 95% confidence intervals. **c**, Relative abundance of metabolites, normalized to the wild-type chow-diet-fed (WT-CD) group. *P* values determined by Welch's *t*-test (*n* = 5 WT-CD; *n* = 3 LAKO-CD; *n* = 5 WT-HFrD; and *n* = 4 LAKO-HFrD mice). Data are mean values.



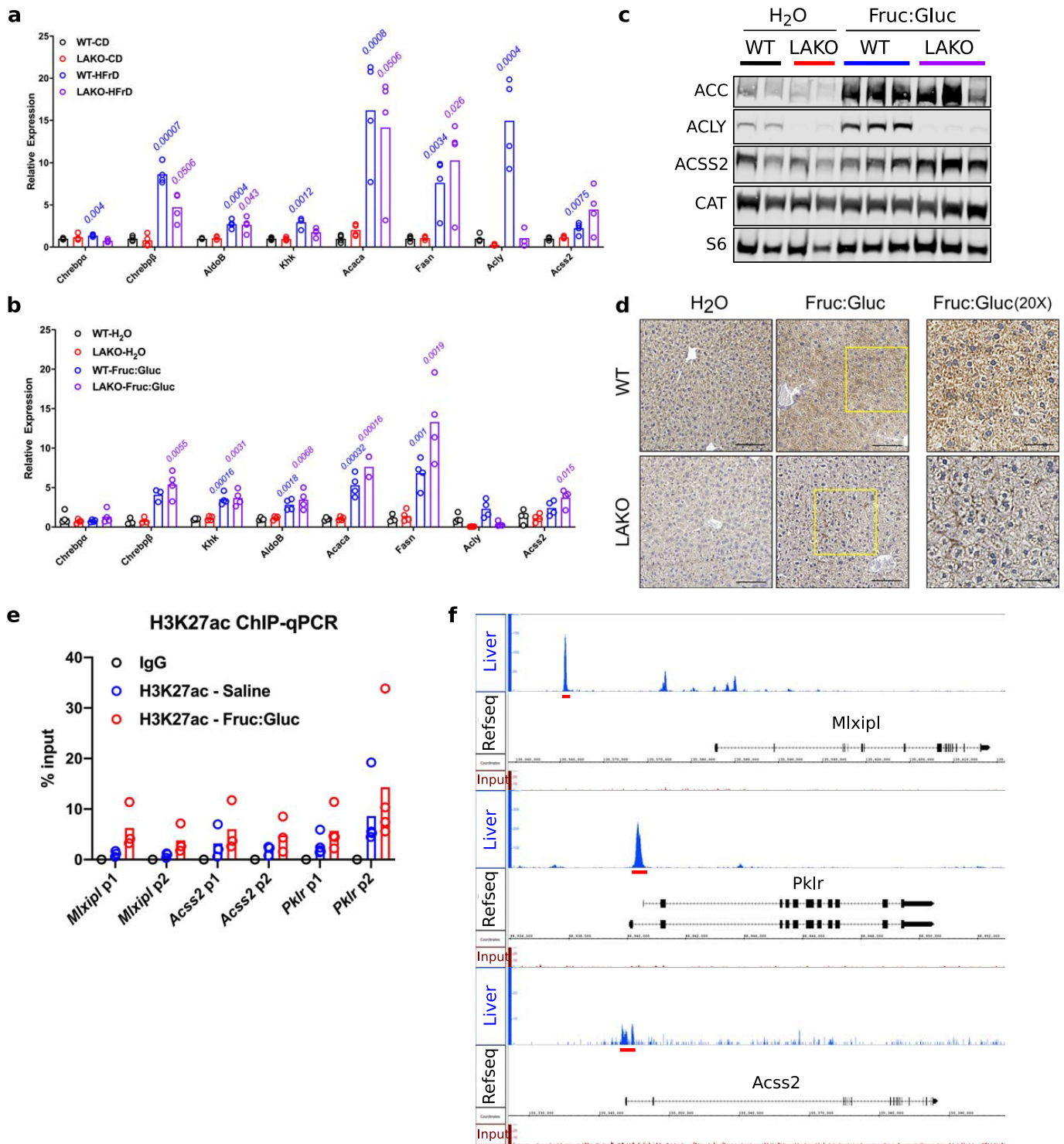
**Extended Data Fig. 3 | A high-fructose diet alters hepatic lipid metabolism.**  
**a**, Hierarchical clustering of relative hepatic triglyceride abundance in wild-type or LAKO mice on a chow diet (CD) or high fructose diet (HFrD) for 4 weeks. Clustering performed using 1–Pearson’s correlation and average linkage.

**b**, Relative abundance of hepatic triglycerides composed of 16:0 to 18:1 fatty acids; a subset of the data in **a**. **c**, Principle component analysis of log-transformed data in Supplementary Table 2. Each dot represents a unique sample; coloured shading denotes 95% confidence intervals.



**Extended Data Fig. 4 | Fructose induces steatosis and contributes substantially to newly synthesized fatty acids in the liver independently of ACLY.** **a**, Schematic of experimental design of the drinking water study. **b**, Daily consumption of unsweetened (H<sub>2</sub>O) or 15% fructose and 15% glucose sweetened (Fruc:Gluc) water per mouse. Each dot represents a repeat measurement, and mean values are shown ( $n = 6$  H<sub>2</sub>O,  $n = 7$  Fruc:Gluc).  $P$  values determined by Welch's  $t$ -test. **c**, Weight gain of wild-type or LAKO mice given water or

fructose:glucose for 4 weeks ( $n = 4$  WT-H<sub>2</sub>O, LAKO-H<sub>2</sub>O;  $n = 8$  WT-Fruc:Gluc; and  $n = 6$  LAKO-Fruc:Gluc mice).  $P$  values comparing all H<sub>2</sub>O versus fructose:glucose mice determined by Welch's  $t$ -test. **d**, Representative H&E and Oil Red O histological stains of livers from mice in **c**. Scale bars, 100  $\mu$ m. **e**, Experimental design for data in Fig. 1c. [U-<sup>13</sup>C] denotes uniformly labelled <sup>13</sup>C. **f**, Isotopologue distribution of labelled saponified fatty acids in serum shown in Fig. 1c. Data are mean  $\pm$  s.d.

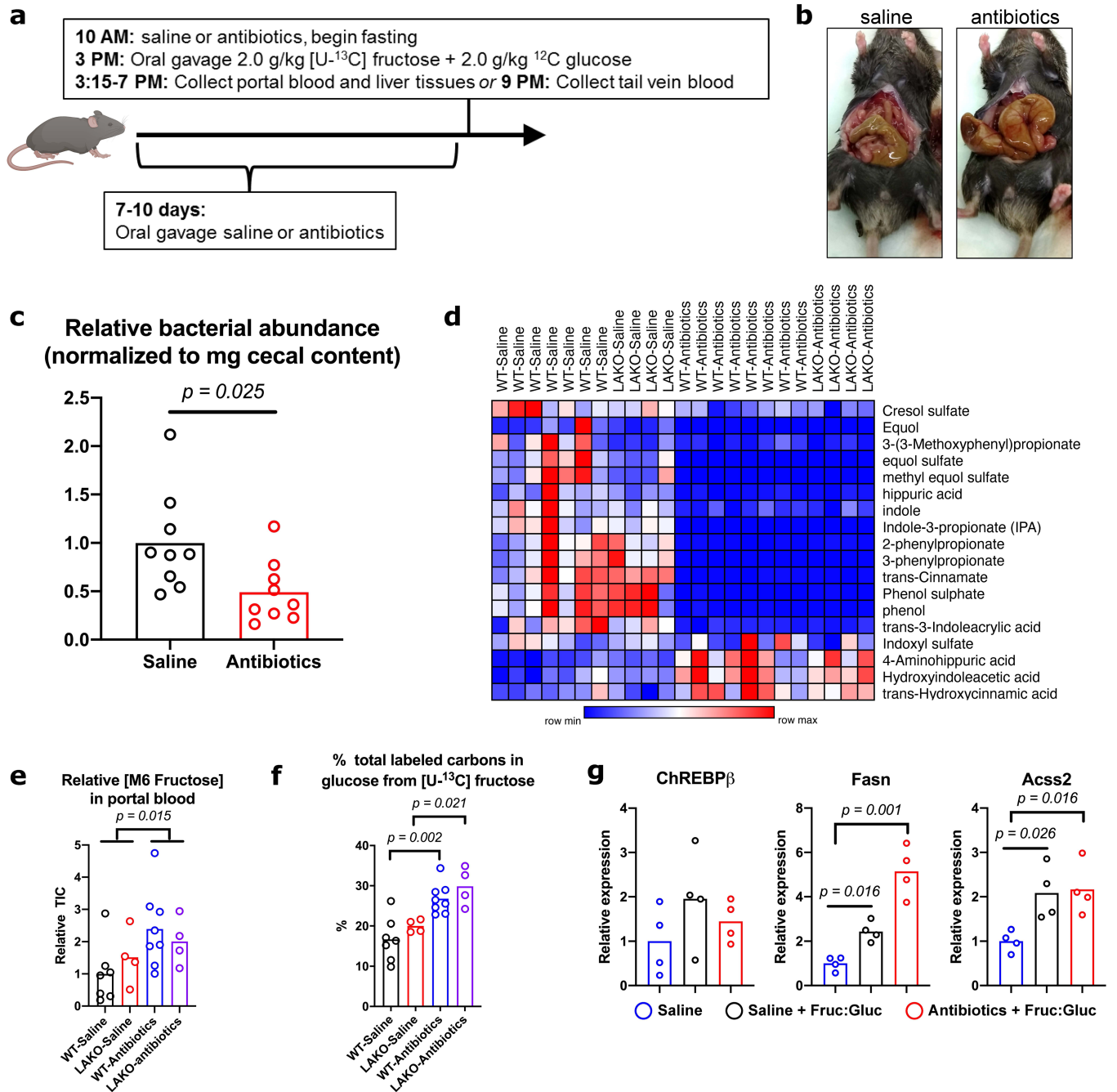


**Extended Data Fig. 5 | Fructose signals the use of acetate for de novo lipogenesis.** **a**, mRNA expression of *ChREBP* and its target genes in livers of wild-type or LAKO mice fed a chow or high-fructose diet ( $n = 4$  mice per group). *P* values for WT-CD versus WT-HFrD (blue text) and for LAKO-CD versus LAKO-HFrD (purple text) determined by two-sided *t*-tests with Holm–Sidak method for multiple comparisons. **b**, mRNA expression of lipogenic genes in livers of wild-type or LAKO mice given H<sub>2</sub>O or fructose:glucose water for 4 weeks ( $n = 4$  mice per group). *P* values for WT-H<sub>2</sub>O versus WT-Fruc:Gluc, WT-H<sub>2</sub>O versus WT-Fruc:Gluc (blue font) and LAKO-H<sub>2</sub>O versus LAKO-Fruc:Gluc (purple font) were determined by two-sided *t*-test with Holm–Sidak method for multiple comparisons. **c**, Western blots of lipogenic enzymes in liver lysates of wild-type or LAKO mice given H<sub>2</sub>O or fructose:glucose water for 4 weeks. Each lane

represents an individual mouse. **d**, Immunohistochemistry staining analysis of ACLY in livers from wild-type or LAKO mice given H<sub>2</sub>O or fructose:glucose water for 4 weeks. Yellow boxes mark the approximate location of the  $\times 20$  panels. Scale bars, 100  $\mu$ m and 50  $\mu$ m (for  $\times 20$ ). **e**, H3K27ac ChIP–quantitative PCR (qPCR) analysis of livers from wild-type mice provided either water for 24 h followed by an oral gavage of saline, or fructose:glucose water for 24 h followed by an oral gavage of 2.0 g kg<sup>-1</sup> glucose and 2.0 g kg<sup>-1</sup> fructose ( $n = 3$  *MLXIP1*, *ACSS2*;  $n = 4$  *PKLR*). Livers were obtained 90 min after gavage. ‘p1’ and ‘p2’ are two different primer sets. **f**, ChIP–seq tracks of *MLXIP1*, *PKLR* and *ACSS2* genomic loci<sup>16</sup>. Red bars indicate genomic regions used to design ChIP–qPCR primers. Data in **a**, **b**, and **e** denote mean values.

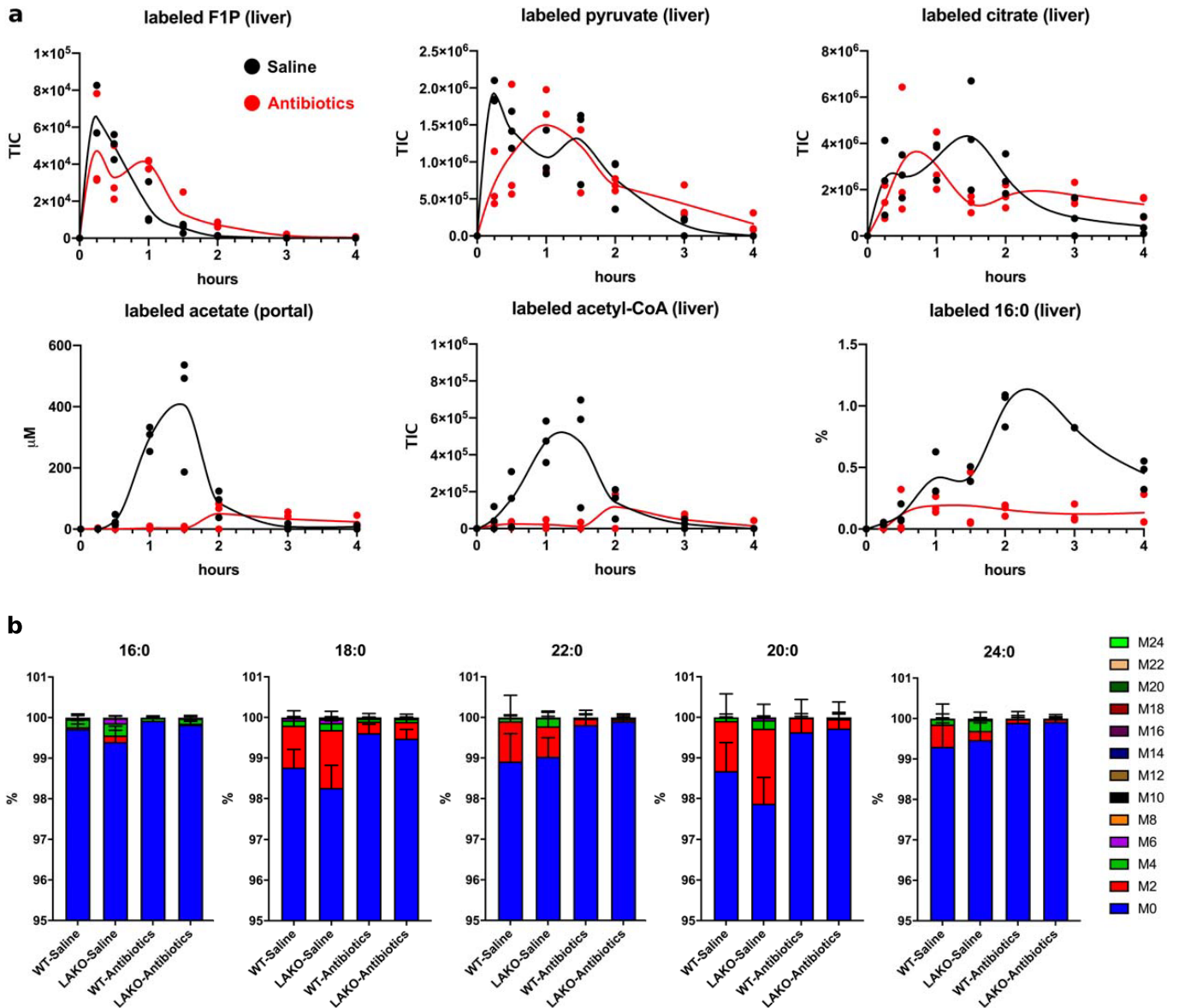


# Article



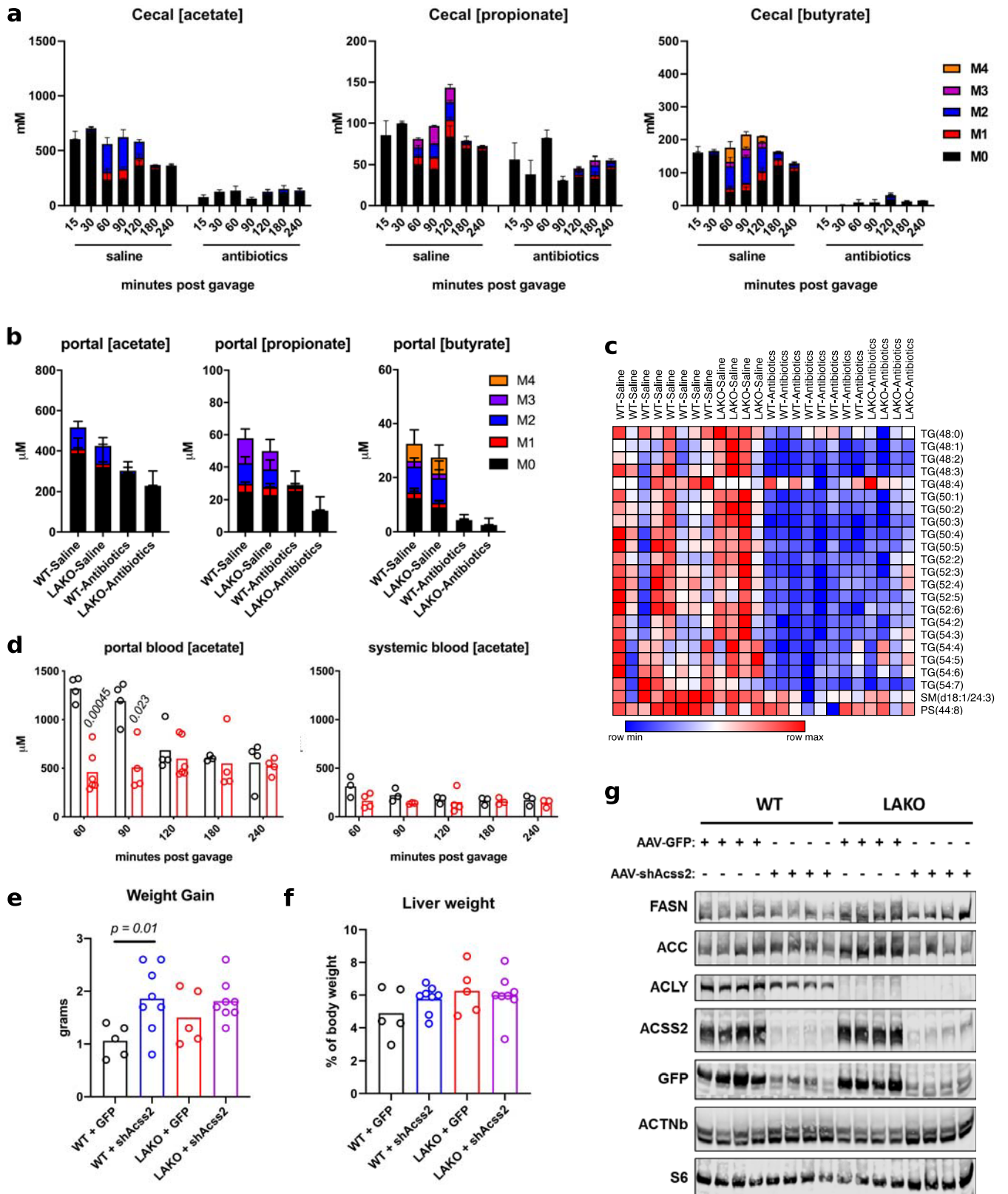
**Extended Data Fig. 6 | Depletion of microbiota blocks substrate contribution, but not signalling component, of de novo lipogenesis after fructose consumption.** **a**, Experimental set-up for antibiotic depletion of the microbiome followed by [<sup>13</sup>C]fructose tracing into DNL. [U-<sup>13</sup>C] denotes uniformly labelled <sup>13</sup>C. **b**, Representative images of caecums from a mouse treated with saline or antibiotics. **c**, Relative abundance of bacteria in caecal contents from mice treated with saline ( $n = 9$ ) or antibiotics ( $n = 9$ ), as determined by 16S RT-qPCR to a reference standard of *Escherichia coli* DNA.  $P$  value determined using Welch's  $t$ -test. **d**, Heat map of microbial metabolite

abundance in the portal blood, collected 1 h after gavage. **e, f**, Relative abundance of [<sup>13</sup>C]fructose (**e**) and percentage of total labelled carbons in glucose (**f**) in portal blood from wild-type or LAKO mice treated with saline or antibiotics, collected 1 h after gavage ( $n = 7$  WT-saline, WT-antibiotics; and  $n = 4$  LAKO-saline, LAKO-antibiotics).  $P$  values determined by Welch's  $t$ -test. **g**, mRNA expression of *ChREBPβ*, *Acss2* and *Fasn* in liver collected 1 h after gavage ( $n = 4$  mice per group).  $P$  values determined by two-sided  $t$ -tests with Holm-Sidak method for multiple comparisons. Data in **c** and **e-g** denote mean values.



**Extended Data Fig. 7 | Bolus fructose is converted into acetate in a microbiota-dependent manner.** **a**, TIC of labelled F1P, pyruvate, citrate and acetyl-CoA in liver, concentration of labelled acetate in portal blood, and percentage of labelled carbons in hepatic saponified fatty acids from wild-type mice treated with saline or antibiotics, and gavaged with  $2.0 \text{ g kg}^{-1}$  [ $^{13}\text{C}$ ]fructose

plus  $2.0 \text{ g kg}^{-1}$  unlabelled glucose ( $n = 3$  mice per time point). Data for saline-treated mice are also shown in Fig. 2d. **b**, Isotopologue distribution of saponified fatty acids in serum from wild-type or LAKO mice fed and treated as in Fig. 3b, and collected 6 h after gavage ( $n = 8$  WT-saline, WT-antibiotics;  $n = 4$  LAKO-saline, LAKO-antibiotics). Data are mean  $\pm$  s.d.

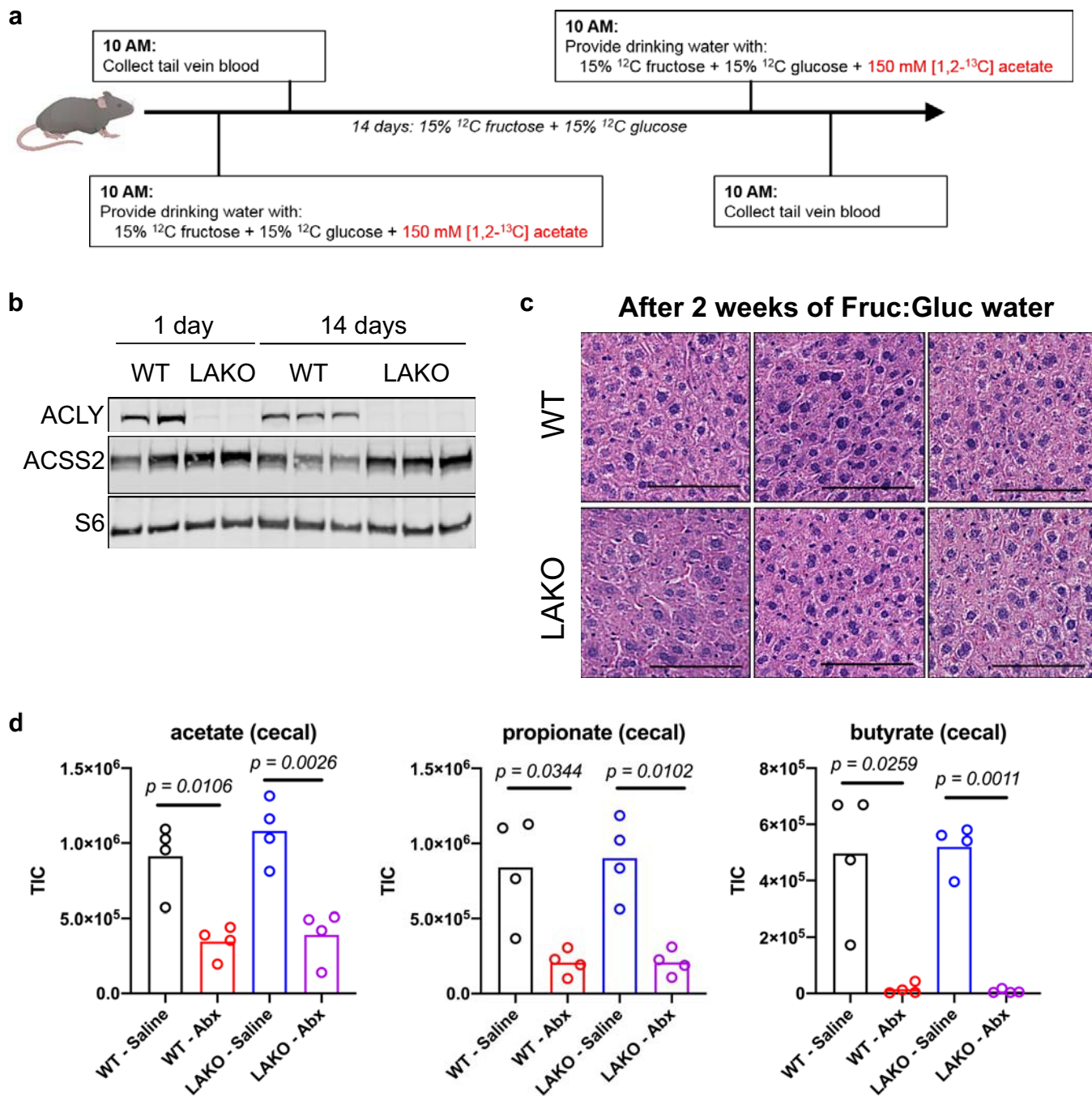


Extended Data Fig. 8 | See next page for caption.

**Extended Data Fig. 8 | Bolus fructose-dependent DNL requires microbial acetate and hepatic ACS2.** **a–d**, Mice were gavaged with  $2.0 \text{ g kg}^{-1}$  [ $^{13}\text{C}$ ]fructose and  $2.0 \text{ g kg}^{-1}$  unlabelled glucose. **a**, Concentrations of labelled acetate, propionate and butyrate in caecal contents from wild-type mice treated with saline or antibiotics ( $n = 3$  mice per time point, except for saline-180  $n = 2$  mice). **b**, Concentrations of labelled acetate, propionate and butyrate in portal blood from wild-type mice treated with saline or antibiotics ( $n = 8$  WT-saline, WT-antibiotics; and  $n = 4$  LAKO-saline, LAKO-antibiotics), collected 1 h after gavage. **c**, Heat map of hepatic triglyceride abundance in livers of mice treated with saline or antibiotics. **d**, Concentrations of acetate in

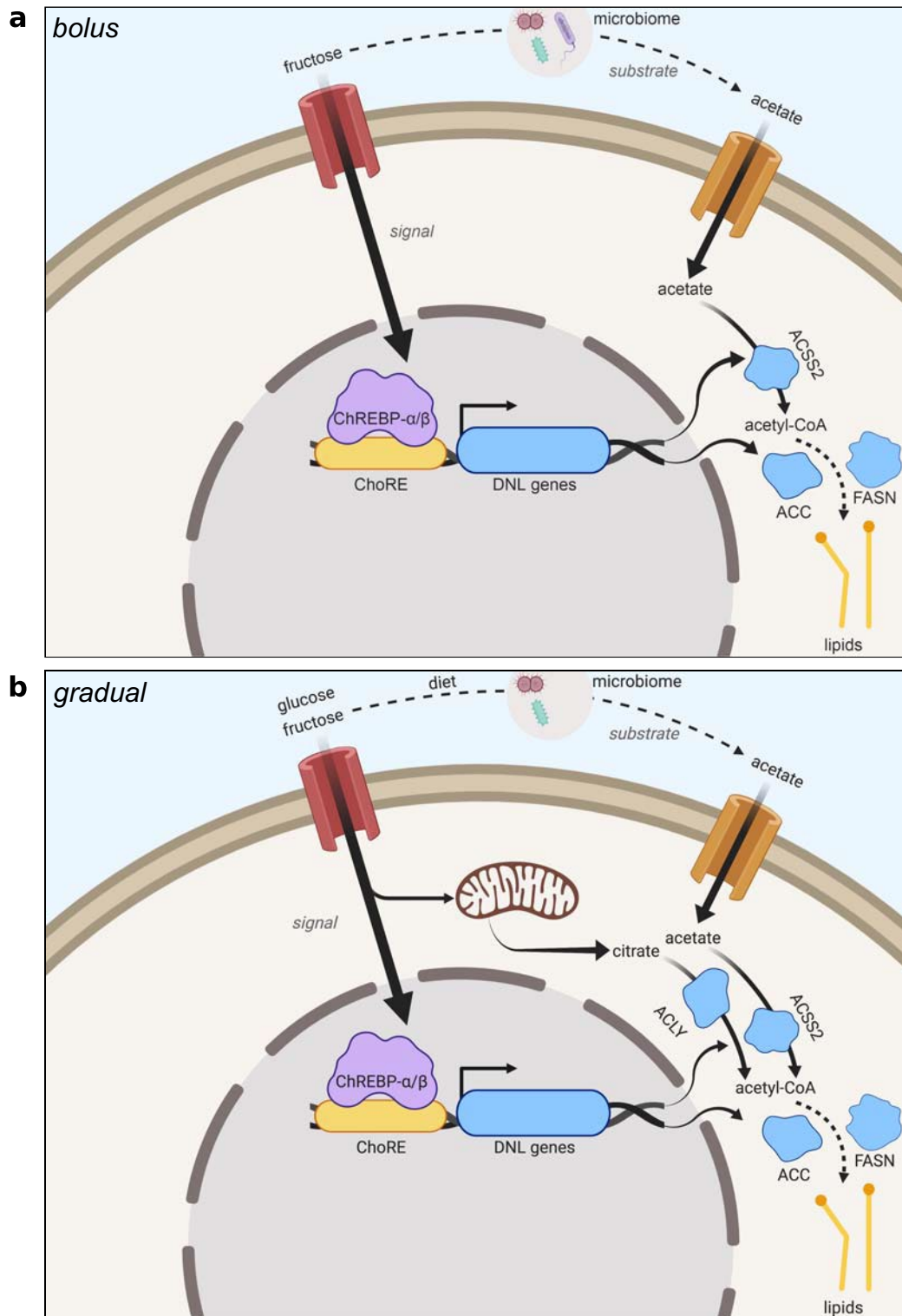
portal and systemic blood after gavage. Each data point represents an individual mouse. *P* value determined by two-sided *t*-tests with Holm–Sidak method for multiple comparisons. **e**, Weight gain in wild-type and LAKO mice 1 week after tail-vein injection of AAV8-GFP or AAV8-shAcsc2. *P* value determined by Welch's *t*-test. **f**, Liver weight of wild-type and LAKO mice as a percentage of body weight 1 week after tail-vein injection of AAV8-GFP or AAV8-shAcsc2. **g**, Western blots of lipogenic enzymes in liver lysates from wild-type and LAKO mice 1 week after tail-vein injection of AAV8-GFP or AAV8-shAcsc2. S6 was used as a loading control.

# Article



**Extended Data Fig. 9 | Gradual fructose consumption promotes greater acetate usage in LAKO mice.** **a**, Experimental set-up for tracing of [1,2-<sup>13</sup>C]acetate into DNL before and after gradual administration of fructose. [1,2-<sup>13</sup>C] denotes <sup>13</sup>C labelling of 1 and 2 position carbons in acetate. **b**, Western blots of lipogenic enzymes in liver lysates from wild-type and LAKO mice after being given fructose:glucose water for 1 or 14 days. **c**, Representative H&E

stains of livers from wild-type and LAKO mice provided fructose:glucose water for 2 weeks. Scale bars, 100  $\mu$ m. **d**, Relative abundance of acetate, propionate and butyrate in the caecal contents of wild-type and LAKO mice treated with saline or antibiotics for 1 week ( $n = 4$  mice per group).  $P$  values determined by Welch's  $t$ -test.



**Extended Data Fig. 10 | Fructose provides signal and substrate to promote hepatic DNL. a.** Proposed model of bolus fructose-induced hepatic DNL. Fructose catabolism in hepatocytes acts as a signal to induce DNL genes including *Acsc2*, whereas fructose metabolism by the gut microbiota provides acetate as a substrate to feed DNL, which is mediated by ACS2. **b.** Proposed model of gradual fructose-induced hepatic DNL. Similar to the bolus model,

fructose catabolism in hepatocytes acts as a signal to induce DNL genes. Catabolism of hepatic fructose and glucose (made from fructose by the small intestine) provides citrate as a substrate to feed DNL, which is mediated by ACLY. Metabolism of fibres and other dietary components by the gut microbiota provides acetate as a substrate to feed DNL, after its conversion to acetyl-CoA by hepatic ACS2. Image created with BioRender.com.

## Reporting Summary

Nature Research wishes to improve the reproducibility of the work that we publish. This form provides structure for consistency and transparency in reporting. For further information on Nature Research policies, see [Authors & Referees](#) and the [Editorial Policy Checklist](#).

### Statistics

For all statistical analyses, confirm that the following items are present in the figure legend, table legend, main text, or Methods section.

n/a Confirmed

- The exact sample size ( $n$ ) for each experimental group/condition, given as a discrete number and unit of measurement
- A statement on whether measurements were taken from distinct samples or whether the same sample was measured repeatedly
- The statistical test(s) used AND whether they are one- or two-sided  
*Only common tests should be described solely by name; describe more complex techniques in the Methods section.*
- A description of all covariates tested
- A description of any assumptions or corrections, such as tests of normality and adjustment for multiple comparisons
- A full description of the statistical parameters including central tendency (e.g. means) or other basic estimates (e.g. regression coefficient) AND variation (e.g. standard deviation) or associated estimates of uncertainty (e.g. confidence intervals)
- For null hypothesis testing, the test statistic (e.g.  $F$ ,  $t$ ,  $r$ ) with confidence intervals, effect sizes, degrees of freedom and  $P$  value noted  
*Give  $P$  values as exact values whenever suitable.*
- For Bayesian analysis, information on the choice of priors and Markov chain Monte Carlo settings
- For hierarchical and complex designs, identification of the appropriate level for tests and full reporting of outcomes
- Estimates of effect sizes (e.g. Cohen's  $d$ , Pearson's  $r$ ), indicating how they were calculated

*Our web collection on [statistics for biologists](#) contains articles on many of the points above.*

### Software and code

Policy information about [availability of computer code](#)

Data collection

Data collection for metabolomics was done using Xcaliber Qual Browser (Thermo Fisher) and TraceFinder (Thermo Fisher)

Data analysis

Data analysis was performed using MAVEN, FluxFix, and GraphPad Prism versions 7 and 8.

For manuscripts utilizing custom algorithms or software that are central to the research but not yet described in published literature, software must be made available to editors/reviewers. We strongly encourage code deposition in a community repository (e.g. GitHub). See the Nature Research [guidelines for submitting code & software](#) for further information.

### Data

Policy information about [availability of data](#)

All manuscripts must include a [data availability statement](#). This statement should provide the following information, where applicable:

- Accession codes, unique identifiers, or web links for publicly available datasets
- A list of figures that have associated raw data
- A description of any restrictions on data availability

All data generated or analysed during this study are included in this published article (and its supplementary information files).

### Field-specific reporting

Please select the one below that is the best fit for your research. If you are not sure, read the appropriate sections before making your selection.

- Life sciences       Behavioural & social sciences       Ecological, evolutionary & environmental sciences

For a reference copy of the document with all sections, see [nature.com/documents/nr-reporting-summary-flat.pdf](https://nature.com/documents/nr-reporting-summary-flat.pdf)

## Life sciences study design

All studies must disclose on these points even when the disclosure is negative.

Sample size	Sample sizes were determined in accordance with the literature and based on previous experience in our group.
Data exclusions	No data were excluded from the analyses in this study.
Replication	Experimental findings were verified by using multiple mice in each study as replicates. Replications were successful.
Randomization	Mice of different genotypes were randomly assigned to treatment groups throughout this study.
Blinding	Sample preparation and data acquisition for metabolomics were performed in a blinded manner.

## Reporting for specific materials, systems and methods

We require information from authors about some types of materials, experimental systems and methods used in many studies. Here, indicate whether each material, system or method listed is relevant to your study. If you are not sure if a list item applies to your research, read the appropriate section before selecting a response.

### Materials & experimental systems

n/a	Involved in the study
<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> Antibodies
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Eukaryotic cell lines
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Palaeontology
<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> Animals and other organisms
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Human research participants
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Clinical data

### Methods

n/a	Involved in the study
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> ChIP-seq
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Flow cytometry
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> MRI-based neuroimaging

## Antibodies

Antibodies used	ACLY (Proteintech, Catalogue #: 15421-1-AP, Lot: 00040639), ACSS2 (Cell Signaling Technology, Catalogue #: 3658, Clone: D19C6, Lot: 2), ACC (Cell Signaling Technology, Catalogue #: 3676, Clone: C83B10, Lot: 9), FASN (Cell Signaling Technology, Catalogue #: 3189, Lot: 2), CHREBP (Novus Biologicals, Catalogue #: NB400-135, Lot: H-1), IgG (Cell Signaling Technology, Catalogue #: 2729, Lot: 8), CAT (Cell Signaling Technology, Catalogue #: 14097, Clone: D5N7V, Lot: 1), S6 (Cell Signaling Technology, Catalogue #: 2217, Lot: 7), Acetyl-H3K27 (Abcam, Catalogue #: ab4729, Lot: GR3216173-1)
Validation	All antibodies were used in accordance to the manufacturer guidelines and confirmed to have previously been documented in the literature through CiteAb ( <a href="http://www.citeab.com">www.citeab.com</a> ).

## Animals and other organisms

Policy information about [studies involving animals](#); [ARRIVE guidelines](#) recommended for reporting animal research

Laboratory animals	Mice used in this study were on a C57bl/6j background, all males, and between the ages of 8-12 weeks for acute experiments. Long-term diet studies were started when mice were around 6-8 weeks of age.
Wild animals	This study did not involve wild animals.
Field-collected samples	This study did not involve field-collected samples.
Ethics oversight	All animal protocols in this study were approved by the Institutional Animal Care and Use Committees (IACUC) at the University of Pennsylvania and Princeton University.

Note that full information on the approval of the study protocol must also be provided in the manuscript.