

Telomerase enzyme deficiency promotes metabolic dysfunction in murine hepatocytes upon dietary stress

Raquel M. Alves-Paiva¹⁻³, Sachiko Kajigaya³, Xingmin Feng³, Jichun Chen³, Marie Desierto³, Susan Wong³, Danielle M. Townsley³, Flávia S. Donaires², Adeline Bertola⁴, Bin Gao⁴, Neal S. Young³, Rodrigo T. Calado^{1,2}

Corresponding author:

Rodrigo T. Calado, MD, PhD

Department of Internal Medicine, FMRP-USP

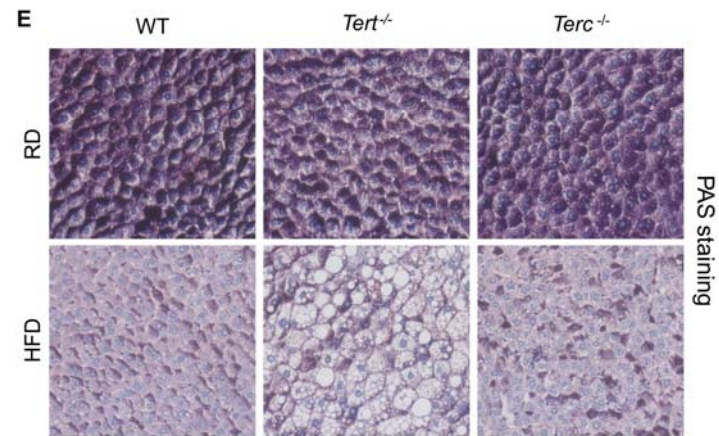
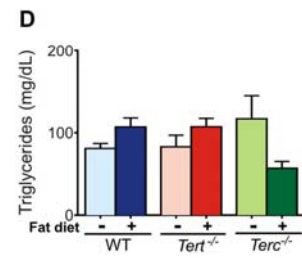
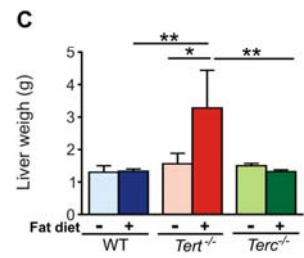
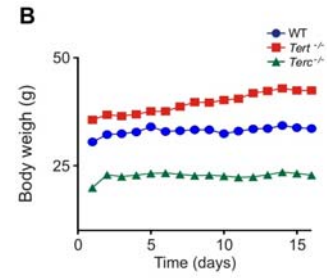
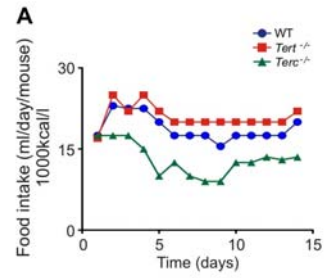
Av. Bandeirantes, 3900 – Lab. Hematologia, bloco G, subsolo – HCRP

Ribeirão Preto, 14049-900 SP, Brazil

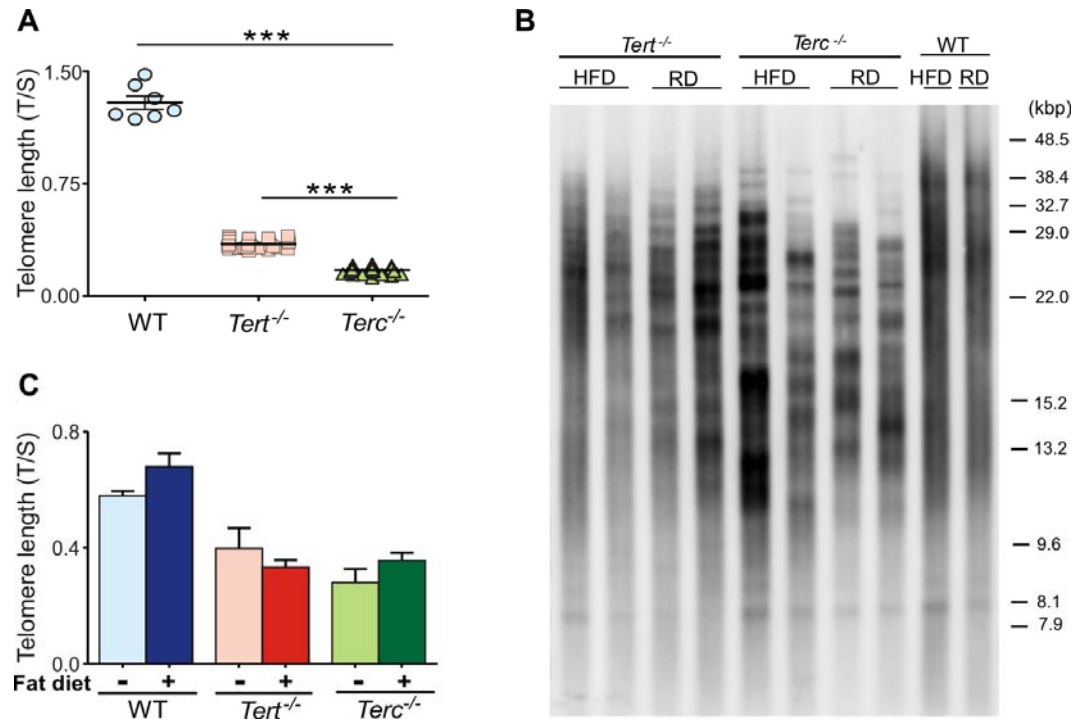
Tel.: +(55)(16) 3602-2294 – Fax: +(55)(16) 3633-1144

E-mail: rtcalado@fmrp.usp.br

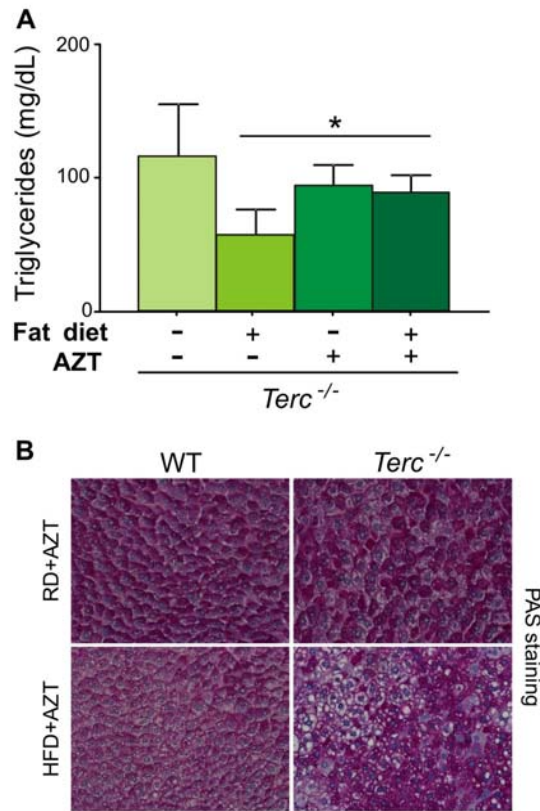
Key words: telomerase-deficient liver/metabolic dysfunction/high fat diet (HFD)/fatty liver



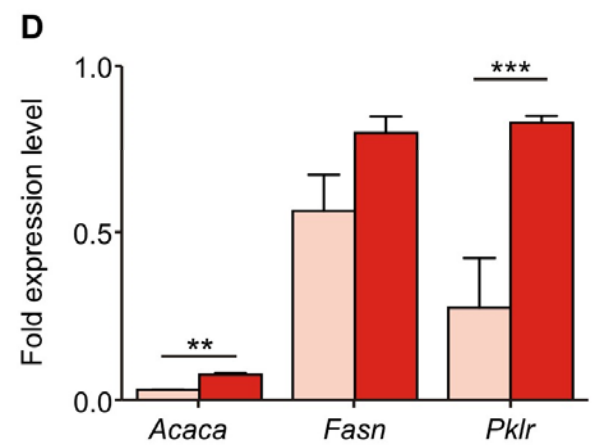
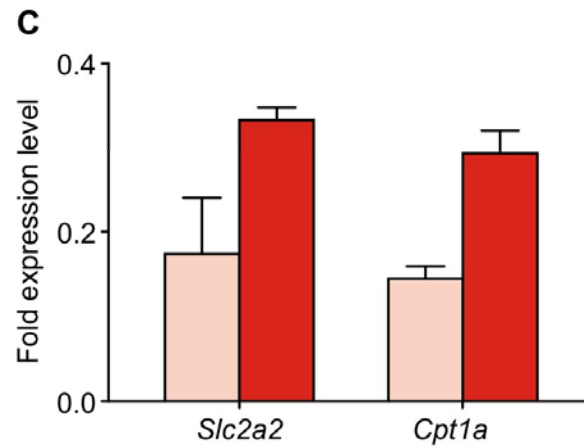
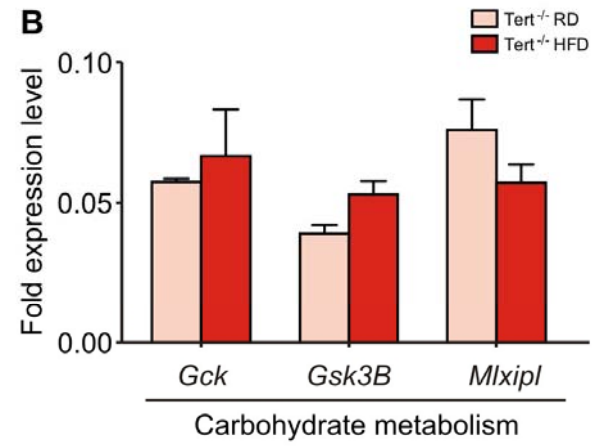
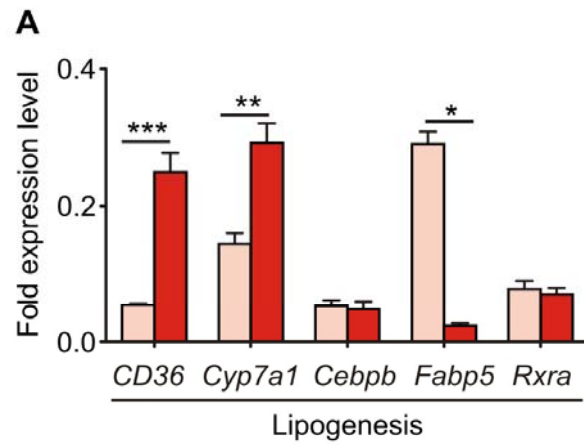
Supplementary Fig. 1. Effects of 15-day HFD in *Tert*^{-/-}, *Terc*^{-/-}, and WT male mice. (A) Food intake related as mL/mouse/day, (B) Body weights of mice fed with HFD, (C) Liver weights of mice with RD and HFD conditions, (D) Serum triglycerides level, and (E) representative light microscopy images of PAS staining in paraffined mouse livers. Apparent reduction of glycogen content was observed after fed HFD. Body weight gain and food intake were measured every day during the experimental period. After day 3, body weights of *Tert*^{-/-} mice were significantly different from those of both *Terc*^{-/-} and WT mice submitted to HFD, following all time points ($P < 0.05$). Mean values were analyzed by Unpaired t-test with Welch's correction. Data represent 6 - 12 animals per group.



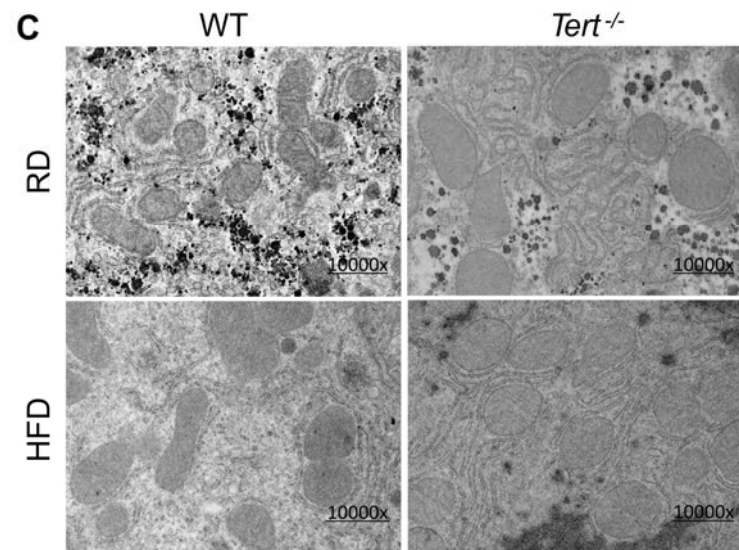
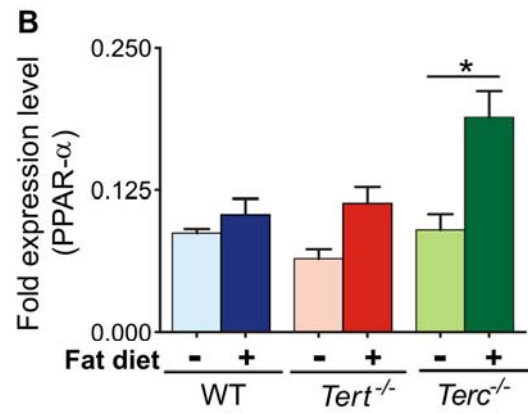
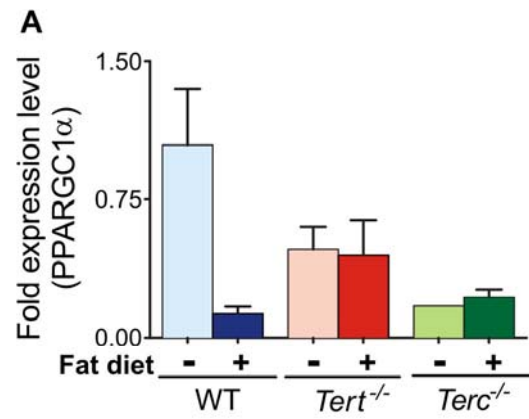
Supplementary Fig. 2. Telomere length analysis in peripheral blood and liver DNAs from WT, *Tert*^{-/-} (G3), and *Terc*^{-/-} (G3) with RD and HFD exposure. Telomere length was measured by (A) qPCR in peripheral blood DNAs (WT: 7 animal per group; *Tert*^{-/-}: 34 animals per group; *Terc*^{-/-}: 45 animals per group) (B) TRF analysis in liver DNAs, and (C) qPCR in liver DNAs. Mean values were analyzed by Unpaired t-test with Welch's correction ($P < 0.05$). Data represent 6-12 animals per group.



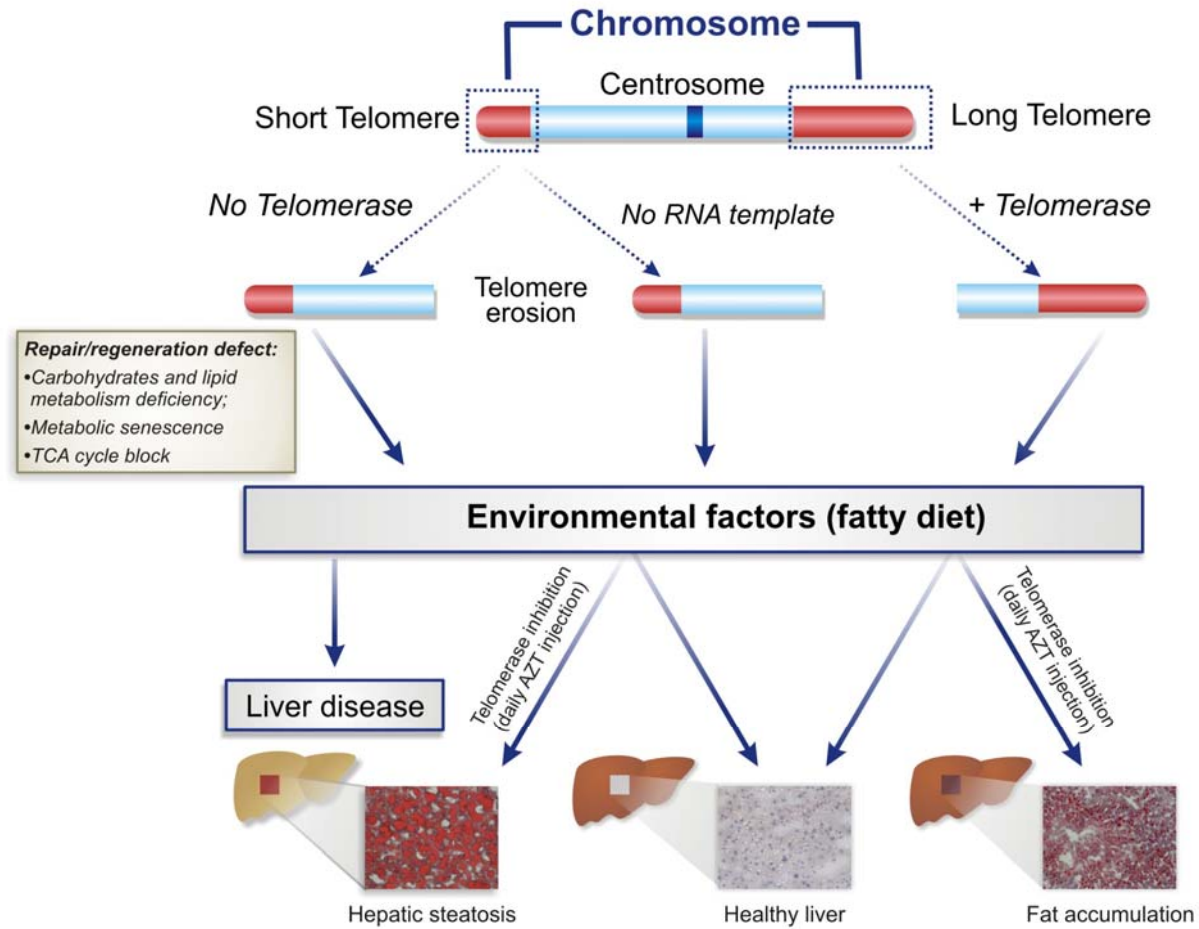
Supplementary Fig. 3. Effects of 15-day HFD in *Terc*^{-/-}, and WT male mice treated with AZT. (A) Serum triglycerides level in *Terc*^{-/-} mouse liver, and (B) representative light microscopy images of PAS staining in paraffined mouse livers, showing apparent increase of glycogen content after fed with HFD. Data represent 6 - 8 animals per group.



Supplementary Fig. 4. Gene expression of master regulators of mitochondrial physiology and metabolism and electron microscopy of WT and *Tert*^{-/-} mouse livers. (A, B) Real-time qPCR validation of PPARGC-1 α and PPAR α in livers tissues. $\Delta\Delta\text{Ct}$ method was used to analyse RT-qPCR data (n = 3 per group), t-test was used to calculate the statistical significance and error bars indicate s.e.m.; (C) Representative electron microscopy pictures used for mitochondrial integrity of WT and *Tert*^{-/-} (G3) mouse livers (n = 3). Mitochondria showed healthy in both mouse livers under RD and HFD conditions.



Supplementary Fig. 5. Gene expression analysis in *Tert*^{-/-} (G1) mouse livers. Gene expression profiles in the liver of 6-months old male mice fed with RD and HFD for 15 days. (A - D) Fold expression levels of affected genes under HFD conditions in *Tert*^{-/-} mouse livers. Error bars represent SD. Statistical significance was determined by test *t* Student **P* < 0.05; ***P* < 0.001; ****P* < 0.0001.



Supplementary Fig. 6. Schematic figure with abnormal profile in *Tert*^{-/-} and *Terc*^{-/-} mouse livers. □ Mice null for the telomerase reverse

transcriptase (*Tert*) or the telomerase RNA component (*Terc*) genes presented abnormal hepatocytes metabolic profiles and on a short-term HFD. Only *Tert*^{-/-} animals develop hepatocyte injury with frank steatosis. *Tert*^{-/-} livers but not *Terc*^{-/-} livers were unable to activate and repress genes involved in metabolic pathways, causing an abnormal metabolomics profile and clinically resulting in overt liver steatosis and hepatocyte injury. Similar liver damage was recapitulated in *Terc*^{-/-} animals fed with HFD when telomerase enzyme was chemically inhibited by zidovudine (AZT; 400 mg/kg/day).

Tables

Supplementary Table 1. General Nutritional Profile

Macronutrients	Regular Diet*	High Dat Diet**
Protein (%)	8	16.7
Fat (%)	6	17.7
Fiber (%)	3.5	4.3
Carbohydrate (%)	44.2	54.3
Ash (%) ***	5.3	3.3
Moisture (%)	-	< 10
Neutral Detergent Fiber	14.7	-

*Harlan Laboratories: Teklad Global 18% Protein Extruded Rodent Diet (sterilizable), #2018SX.

**BioServ: Lieber-DeCarli '82 Shake and Pour control liquid diet, #F1259SP.

***Ash: Analytical chemistry.

Supplementary Table 2. Comparative analysis of mouse liver metabolites

HMT DB Compound name	Concentration (nmol/g)											
	WT RD		WT HFD		<i>Tert</i> ^{-/-} RD		<i>Tert</i> ^{-/-} HFD		<i>Terc</i> ^{-/-} RD		<i>Terc</i> ^{-/-} HFD	
	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.
NAD ⁺	256	164	114	18	202	34	266	56	173	85	67	53
cAMP	0,4	0,12	0,2	0,03	0,2	0,014	0,3	0,03	0,2	0,06	0,3	0,010
cGMP	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.	0,006	0,002	0,006	4,8E-04	0,007	0,002	0,02	0,008
Xanthine	288	142	450	111	139	39	143	48	196	75	342	80
NADH	7,2	2,1	4,7	0,3	2,8	0,4	2,8	0,2	2,8	0,10	2,6	0,4
ADP-ribose	202	76	184	60	147	32	158	11	210	49	152	41
Mevalonic acid	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.
UDP-glucose	107	122	36	25	66	27	65	52	63	25	18	7,5
Uric acid	190	31	139	74	15	5,2	23	12	53	62	67	32
NADP ⁺	26	33	5,9	2,4	23	10	22	9,3	19	14	3,8	0,4
IMP	205	73	170	22	104	55	150	83	133	53	69	19
Sedoheptulose 7-phosphate	174	88	121	17	86	34	64	19	89	14	35	9,7
Glucose 6-phosphate	284	67	156	30	201	86	117	35	195	35	124	25
Fructose 6-phosphate	68	21	39	6,5	79	30	53	18	74	21	56	15
Fructose 1-phosphate	41	5,2	25	5,5	38	7,7	26	11	47	21	34	9,2
Galactose 1-phosphate	48	14	45	3,1	37	15	22	3,7	37	12	37	2,8
Glucose 1-phosphate	21	4,8	14	5,7	18	8,3	10	2,6	17	6,2	9,6	2,3
Acetoacetyl CoA	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.	0,006	0,002	0,004	N.A.	0,004	N.A.	0,004	1,4E-03
Acetyl CoA	4,6	4,9	2,2	0,5	4,6	3,7	5,7	2,2	6,0	5,0	2,1	0,3

Folic acid	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.	0,02	0,005	0,02	0,002	0,03	0,007	0,05	0,03
Ribose 5-phosphate	21	5,8	25	3,7	41	10	38	2,5	61	7,5	46	8,9
CoA	39	14	55	7,6	168	14	181	11	205	103	135	12
Ribose 1-phosphate	256	49	247	13	209	22	223	25	272	75	121	30
Ribulose 5-phosphate	3,5	2,0	2,7	1,9	3,0	1,1	2,3	1,1	2,7	3,0	12	6,2
Xylulose 5-phosphate	7,2	5,2	6,8	4,5	6,7	4,5	3,8	1,1	6,3	3,4	19	7,0
Erythrose 4-phosphate	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.	0,5	0,4	0,5	0,4	0,6	0,2	N.D.	N.A.
HMG CoA	0,2	0,011	0,12	0,011	0,09	0,02	0,07	0,04	0,2	0,07	0,08	0,015
Glyceraldehyde 3-phosphate	10	1,7	7,6	3,3	4,3	1,3	3,6	2,9	5,4	1,9	4,7	2,6
NADPH	3,7	0,7	2,1	0,2	1,8	0,4	1,7	0,02	1,7	0,04	1,6	0,2
Malonyl CoA	N.D.	N.A.	0,06	N.A.	0,14	N.A.	0,13	N.A.	0,13	0,012	0,11	N.A.
Phosphocreatine	6,9	N.A.	0,2	0,2	0,9	0,6	0,5	0,04	0,5	0,4	0,9	0,8
XMP	0,4	0,2	0,9	0,2	0,2	0,13	0,3	0,06	0,4	0,3	0,5	0,3
Dihydroxyacetone phosphate	100	5,1	93	26	125	14	98	40	160	62	189	66
Adenylosuccinic acid	25	7,8	30	10	59	12	27	2,5	65	38	38	11
Fructose 1,6-diphosphate	24	9,7	18	14	22	9,7	9,1	5,9	33	24	82	69
6-Phosphogluconic acid	32	0,9	26	6,0	50	22	22	3,3	44	19	32	11
<i>N</i> -Carbamoylaspartic acid	1,0	0,8	1,5	1,5	4,2	6,7	4,2	6,7	0,4	0,4	0,5	0,6
PRPP	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.	1,4	0,3	1,4	0,5	1,9	1,1	1,0	0,2
2-Phosphoglyceric acid	13	6,8	12	2,4	1,4	0,13	1,0	0,5	2,7	2,3	1,6	1,3
2,3-Diphosphoglyceric acid	23	15	29	4,0	92	14	88	54	95	34	106	59
3-Phosphoglyceric acid	129	65	113	29	16	1,1	11	5,3	31	27	17	16
Phosphoenolpyruvic acid	42	20	39	7,8	4,4	0,3	2,6	1,3	8,0	7,1	4,5	4,3
GMP	295	48	226	23	248	20	211	14	261	48	160	11
AMP	1.626	186	1.142	189	1.197	127	1.079	64	1.049	233	815	89
2-Oxoisovaleric acid	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.
GDP	14	6,9	13	0,8	18	1,2	16	3,0	18	3,3	18	0,7
Lactic acid	21.211	6.066	20.413	2.633	15.893	2.226	18.784	2.580	19.400	2.099	23.094	579
ADP	238	144	114	43	254	45	217	22	258	71	113	21
GTP	11	1,7	6,8	0,4	4,7	1,3	3,6	0,7	5,1	1,1	3,8	0,6
Glyoxylic acid	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.	5,6	N.A.	N.D.	N.A.
ATP	35	19	16	1,8	53	25	35	8,7	68	32	17	5,4
Glycerol 3-phosphate	1.464	599	1.202	220	1.383	462	786	123	1.417	649	587	130
Glycolic acid	30	N.A.	27	8,1	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.

Pyruvic acid	82	37	48	15	179	69	232	61	261	41	91	21
<i>N</i> -Acetylglutamic acid	46	11	57	16	60	29	56	28	58	8,0	45	44
2-Hydroxyglutaric acid	29	6,5	24	3,2	11	2,2	18	1,6	16	9,3	20	13
Carbamoylphosphate	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.	1,5	N.A.	0,4	N.A.	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.
Succinic acid	1.201	412	1.258	181	783	380	884	255	850	460	768	244
Malic acid	555	87	460	111	321	104	78	47	417	135	422	190
2-Oxoglutaric acid	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.
Fumaric acid	127	18	114	32	113	38	30	5,6	147	39	130	56
Citric acid	39	17	21	13	49	13	44	4,1	34	29	28	13
<i>cis</i> -Aconitic acid	1,8	0,2	0,7	0,4	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.
Isocitric acid	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.
Urea	7.508	825	5.176	691	6.702	1.676	3.927	959	7.087	2.541	5.900	588
Gly	2.647	184	2.262	474	2.307	415	1.913	23	2.822	306	2.235	180
Putrescine	6,4	2,3	17	10	8,9	1,6	15	4,9	4,9	1,2	28	18
Sarcosine	122	4,0	127	29	85	44	59	15	121	33	93	34
β -Ala	192	37	234	14	228	8,3	228	193	262	97	428	34
Ala	5.544	758	5.419	1.073	4.046	1.007	5.580	1.501	4.668	1.352	4.917	1.213
γ -Aminobutyric acid	43	1,3	46	7,9	23	8,8	7,3	2,1	33	4,4	34	9,6
<i>N,N</i> -Dimethylglycine	75	2,9	43	16	60	38	36	16	51	23	70	27
Choline	195	35	285	124	228	248	228	60	378	137	309	60
Ser	351	80	210	24	373	61	218	36	402	96	337	129
Creatinine	3,7	1,2	4,0	1,8	5,5	2,3	3,7	2,8	5,4	2,5	5,2	2,0
Pro	265	42	414	69	324	63	346	169	452	48	586	96
Betaine	671	59	167	95	1.742	889	456	150	834	218	962	639
Val	607	10	490	39	474	165	449	64	650	31	578	57
Thr	415	18	325	69	353	70	314	43	483	50	451	41
Homoserine	1,9	0,5	0,9	0,8	2,1	0,6	1,4	0,3	1,5	0,3	2,1	1,0
Betaine aldehyde	3,0	1,0	3,5	2,4	4,5	6,4	3,6	1,8	7,8	5,8	4,0	1,7
Cys	11	6,8	16	16	7,2	3,9	13	9,9	21	21	12	12
Hydroxyproline	39	14	53	11	46	1,4	21	13	34	11	23	3,9
Creatine	303	60	324	102	395	154	221	76	364	137	503	185
Ile	332	20	262	24	257	95	211	43	345	39	314	68
Leu	601	2,5	544	90	540	153	433	58	667	71	677	143
Asn	197	5,6	181	18	192	38	149	27	255	44	250	68

Ornithine	297	25	320	58	322	117	188	21	343	48	409	71
Asp	312	89	282	54	407	69	220	68	362	65	419	123
Homocysteine	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.
Adenine	5,2	1,5	6,1	1,8	6,7	0,8	6,4	1,6	6,9	1,8	4,6	0,6
Hypoxanthine	203	79	311	51	198	74	120	33	223	83	459	84
Spermidine	135	53	125	18	60	7,6	75	14	49	7,1	70	19
Gln	3.022	666	3.278	511	2.578	1.569	2.830	733	2.712	1.136	2.860	654
Lys	623	67	797	12	790	161	805	333	949	155	1.290	81
Glu	1.453	514	1.669	383	1.093	455	824	308	1.350	347	1.007	90
Met	100	3,7	114	19	98	7,8	71	18	133	31	144	38
Guanine	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.
His	528	99	491	34	565	80	568	8,0	546	32	608	146
Carnitine	210	57	198	38	316	153	201	23	257	13	185	42
Phe	215	6,0	213	38	232	43	187	31	273	57	290	58
Arg	9,6	3,5	4,9	1,3	2,4	1,4	1,8	0,7	2,5	0,5	2,1	0,7
Citrulline	49	7,3	22	4,3	24	5,0	18	4,7	25	13	22	10
Tyr	214	23	262	40	189	35	169	13	281	93	327	131
Spermine	30	23	20	2,7	27	9,7	25	8,0	29	4,4	23	4,1
Trp	69	3,7	62	6,4	53	12	49	5,8	69	26	90	17
Cystathionine	21	3,7	22	6,9	19	9,0	25	9,3	27	2,0	68	29
Carnosine	3,9	0,5	3,0	0,4	2,3	0,6	1,7	0,06	2,2	0,13	2,0	0,2
Adenosine	43	18	24	4,9	46	4,2	29	9,4	34	15	25	5,8
Inosine	668	316	873	108	744	223	547	194	919	108	806	179
Guanosine	14	3,3	8,0	0,7	19	5,6	9,4	3,3	17	6,3	12	3,1
Argininosuccinic acid	13	5,9	5,3	1,0	6,3	1,1	2,8	0,2	5,4	2,1	3,0	0,4
Glutathione (GSSG)	984	358	1.038	78	1.534	93	1.033	113	1.434	295	976	238
Glutathione (GSH)	5.354	515	5.264	381	4.279	440	3.665	671	3.762	254	3.284	357
S-Adenosylhomocysteine	69	3,3	80	16	54	18	31	4,0	69	15	46	5,3
S-Adenosylmethionine	55	16	26	7,1	61	19	55	33	46	12	36	19
Adenylate Energy Charge	0,08	0,03	0,06	0,009	0,12	0,03	0,11	0,013	0,14	0,02	0,08	0,012
Total Adenylate	1.900	349	1.273	229	1.504	134	1.331	76	1.375	317	945	107
Guanylate Energy Charge	0,05	0,006	0,05	0,006	0,05	0,006	0,05	0,011	0,05	0,004	0,07	9,3E-04
Total Guanylate	320	56	246	23	271	20	231	12	284	52	182	12
GSH/GSSG	5,8	1,6	5,1	0,7	2,8	0,4	3,6	1,0	2,7	0,6	3,5	0,9

Total Glutathione	7.323	1.050	7.340	245	7.347	373	5.731	510	6.630	415	5.236	534
NADPH/NADP+	0,3	0,3	0,4	0,15	0,08	0,02	0,08	0,03	0,07	0,03	0,4	0,04
NADH/NAD+	0,03	0,011	0,04	0,004	0,014	1,3E-03	0,011	1,5E-03	0,02	0,009	0,05	0,02
Lactate/Pyruvate	276	59	465	190	98	37	84	16	77	22	264	56
Glycerol 3-phosphate/DHAP	15	5,9	14	5,4	11	3,1	9,1	4,0	9,2	2,9	3,6	2,3
Total Amino Acids	17.512	1.084	17.298	2.581	14.880	3.459	15.351	1.228	17.443	2.209	17.395	2.708
Total Essential Amino Acids	3.489	191	3.298	251	3.362	727	3.088	295	4.116	180	4.443	472
Total Non-essential Amino Acids	14.022	968	14.000	2.363	11.518	2.878	12.263	1.120	13.327	2.389	12.952	2.290
Total Glucogenic Amino Acids	16.288	1.046	15.956	2.520	13.549	3.190	14.113	980	15.827	2.202	15.428	2.634
Total Ketogenic Amino Acids	2.469	76	2.464	224	2.413	524	2.168	264	3.068	182	3.440	373
Total BCAA	1.541	21	1.296	142	1.271	412	1.093	164	1.662	138	1.570	255
Total Aromatic Amino Acids	498	26	537	84	474	88	405	41	624	171	708	205
Fischer's Ratio	3,1	0,2	2,4	0,2	2,7	0,7	2,7	0,13	2,8	0,7	2,3	0,4
Total Glu-related Amino Acids	5.278	1.153	5.857	886	4.562	2.128	4.570	360	5.062	1.398	5.063	949
Total Pyr-related Amino Acids	9.033	846	8.295	1.627	7.138	1.076	8.087	1.409	8.465	1.235	8.041	1.219
Total Acetyl CoA-related Amino Acids	1.625	84	1.665	105	1.640	407	1.498	288	2.030	98	2.371	186
Total Fumarate-related Amino Acids	429	23	475	77	421	77	356	36	555	146	618	188
Total Succinyl CoA-related Amino Acids	1.039	19	866	60	829	261	731	101	1.128	85	1.036	151
Total Oxaloacetate-related Amino Acids	509	94	463	38	599	92	369	43	617	26	670	189
Malate/Asp	1,9	0,5	1,6	0,4	0,8	0,4	0,4	0,3	1,2	0,4	1,0	0,3
Citrulline/Ornithine	0,2	0,02	0,07	0,02	0,09	0,05	0,10	0,04	0,08	0,05	0,06	0,04
Glu/2-Oxoglutarate	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.
G6P/R5P	15	8,9	6,6	2,4	4,8	1,1	3,1	1,0	3,2	0,6	2,8	0,9
SAM/SAH	0,8	0,2	0,3	0,13	1,3	0,6	1,9	1,2	0,7	0,3	0,8	0,4
Putrescine/Spermidine	0,05	0,03	0,14	0,08	0,15	0,02	0,2	0,11	0,10	0,012	0,5	0,3

N.D. (Not Detected): The target peak or metabolite was below detection limits.

N.A. (Not Available): The calculation was impossible because of insufficiency of the data.

Supplementary Table 3. Comparative analysis of mouse liver metabolites

HMT DB Compound name	Comparative analysis					
	WT RD vs WT HFD		<i>Tert</i> ^{-/-} RD vs <i>Tert</i> ^{-/-} HFD		<i>Terc</i> ^{-/-} RD vs <i>Terc</i> ^{-/-} HFD	
	Ratio ¶	<i>p</i> -value ¶¶	Ratio ¶	<i>p</i> -value ¶¶	Ratio ¶	<i>p</i> -value ¶¶
NAD ⁺	0,4	0,273	1,3	0,181	0,4	0,155
cAMP	0,5	0,119	1,3	0,057	1,1	0,632
cGMP	N.A.	N.A.	0,9	0,798	2,2	0,192
Xanthine	1,6	0,198	1,0	0,914	1,7	0,084
NADH	0,7	0,181	1,0	0,914	0,9	0,613
ADP-ribose	0,9	0,757	1,1	0,623	0,7	0,194
Mevalonic acid	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
UDP-glucose	0,3	0,420	1,0	0,984	0,3	0,075
Uric acid	0,7	0,365	1,6	0,355	1,3	0,740
NADP ⁺	0,2	0,399	1,0	0,906	0,2	0,198
IMP	0,8	0,491	1,4	0,474	0,5	0,164
Sedoheptulose 7-phosphate	0,7	0,407	0,7	0,388	0,4	0,008**
Glucose 6-phosphate	0,5	0,063	0,6	0,231	0,6	0,054
Fructose 6-phosphate	0,6	0,124	0,7	0,283	0,8	0,311
Fructose 1-phosphate	0,6	0,023 *	0,7	0,193	0,7	0,410
Galactose 1-phosphate	0,9	0,699	0,6	0,201	1,0	0,997
Glucose 1-phosphate	0,7	0,189	0,6	0,253	0,6	0,176
Acetoacetyl CoA	N.A.	N.A.	0,6	N.A.	1,1	N.A.
Acetyl CoA	0,5	0,485	1,2	0,687	0,4	0,315

Folic acid	N.A.	N.A.	0,9	0,430	1,8	0,520
Ribose 5-phosphate	1,2	0,398	0,9	0,664	0,8	0,089
CoA	1,4	0,182	1,1	0,294	0,7	0,359
Ribose 1-phosphate	1,0	0,784	1,1	0,510	0,4	0,058
Ribulose 5-phosphate	0,8	0,718	0,8	0,521	4,3	0,127
Xylulose 5-phosphate	0,9	0,930	0,6	0,384	3,0	0,068
Erythrose 4-phosphate	N.A.	N.A.	1,0	0,989	<1	N.A.
HMG CoA	0,8	0,015*	0,8	0,464	0,4	0,142
Glyceraldehyde 3-phosphate	0,8	0,323	0,8	0,751	0,9	0,720
NADPH	0,6	0,041*	0,9	0,603	0,9	0,404
Malonyl CoA	1<	N.A.	1,0	N.A.	0,9	N.A.
Phosphocreatine	0,03	N.A.	0,5	0,280	1,8	0,496
XMP	2,4	0,030*	1,2	0,627	1,4	0,581
Dihydroxyacetone phosphate	0,9	0,702	0,8	0,359	1,2	0,604
Adenylosuccinic acid	1,2	0,532	0,5	0,042*	0,6	0,350
Fructose 1,6-diphosphate	0,8	0,581	0,4	0,130	2,5	0,339
6-Phosphogluconic acid	0,8	0,197	0,4	0,154	0,7	0,424
<i>N</i> -Carbamoylaspartic acid	1,5	0,635	1,0	0,999	1,1	0,905
PRPP	N.A.	N.A.	1,0	0,899	0,5	0,295
2-Phosphoglyceric acid	0,9	0,740	0,7	0,214	0,6	0,496
2,3-Diphosphoglyceric acid	1,3	0,557	1,0	0,906	1,1	0,785
3-Phosphoglyceric acid	0,9	0,726	0,7	0,245	0,6	0,517
Phosphoenolpyruvic acid	0,9	0,824	0,6	0,143	0,6	0,511
GMP	0,8	0,113	0,9	0,068	0,6	0,061
AMP	0,7	0,034*	0,9	0,245	0,8	0,218
2-Oxoisovaleric acid	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
GDP	0,9	0,800	0,9	0,362	1,0	0,872
Lactic acid	1,0	0,849	1,2	0,217	1,2	0,084
ADP	0,5	0,270	0,9	0,294	0,4	0,062
GTP	0,6	0,051	0,8	0,279	0,8	0,179
Glyoxylic acid	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	<1	N.A.
ATP	0,5	0,231	0,7	0,346	0,2	0,104
Glycerol 3-phosphate	0,8	0,537	0,6	0,147	0,4	0,153
Glycolic acid	0,9	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
Pyruvic acid	0,6	0,254	1,3	0,377	0,3	0,008**
<i>N</i> -Acetylglutamic acid	1,2	0,410	0,9	0,868	0,8	0,663

Adenine	1,2	0,522	0,9	0,765	0,7	0,142
Hypoxanthine	1,5	0,130	0,6	0,201	2,1	0.026*
Spermidine	0,9	0,767	1,2	0,215	1,4	0,191
Gln	1,1	0,627	1,1	0,818	1,1	0,857
Lys	1,3	0.042*	1,0	0,950	1,4	0.043*
Glu	1,1	0,593	0,8	0,451	0,7	0,224
Met	1,1	0,319	0,7	0,112	1,1	0,726
Guanine	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
His	0,9	0,594	1,0	0,950	1,1	0,538
Carnitine	0,9	0,769	0,6	0,322	0,7	0,090
Phe	1,0	0,923	0,8	0,221	1,1	0,733
Arg	0,5	0,134	0,8	0,567	0,9	0,489
Citrulline	0,4		0,8	0,229	0,9	0,794
		0.009**				
Tyr	1,2	0,164	0,9	0,428	1,2	0,646
Spermine	0,7	0,531	0,9	0,813	0,8	0,174
Trp	0,9	0,215	0,9	0,634	1,3	0,331
Cystathionine	1,0	0,850	1,3	0,492	2,5	0,132
Carnosine	0,8	0,102	0,7	0,238	0,9	0,181
Adenosine	0,6	0,210	0,6	0,070	0,7	0,401
Inosine	1,3	0,380	0,7	0,312	0,9	0,416
Guanosine	0,6	0,096	0,5	0,085	0,7	0,262
Argininosuccinic acid	0,4	0,159	0,4	0.027*	0,6	0,191
Glutathione (GSSG)	1,1	0,823	0,7	0.005**	0,7	0,108
Glutathione (GSH)	1,0	0,820	0,9	0,266	0,9	0,139
S-Adenosylhomocysteine	1,2	0,350	0,6	0,141	0,7	0,110
S-Adenosylmethionine	0,5	0,075	0,9	0,778	0,8	0,491
Adenylate Energy Charge	0,7	0,364	0,9	0,585	0,5	0.026*
Total Adenylate	0,7	0,069	0,9	0,142	0,7	0,132
Guanylate Energy Charge	1,0	0,936	1,0	0,965	1,4	0.011*
Total Guanylate	0,8	0,136	0,9	0,056	0,6	0,069
GSH/GSSG	0,9	0,539	1,3	0,304	1,3	0,280
Total Glutathione	1,0	0,981	0,8	0.014*	0,8	0.026*
NADPH/NADP+	1,1	0,820	1,0	0,987	5,4	0.018*
NADH/NAD+	1,3	0,277	0,8	0.044*	2,7	0,130
Lactate/Pyruvate	1,7	0,221	0,9	0,582	3,4	0.018*

Glycerol 3-phosphate/DHAP	0,9	0,867	0,8	0,543	0,4	0,063
Total Amino Acids	1,0	0,904	1,0	0,841	1,0	0,982
Total Essential Amino Acids	0,9	0,356	0,9	0,593	1,1	0,356
Total Non-essential Amino Acids	1,0	0,989	1,1	0,708	1,0	0,854
Total Glucogenic Amino Acids	1,0	0,848	1,0	0,793	1,0	0,851
Total Ketogenic Amino Acids	1,0	0,978	0,9	0,522	1,1	0,221
Total BCAA	0,8	0,093	0,9	0,544	0,9	0,618
Total Aromatic Amino Acids	1,1	0,512	0,9	0,309	1,1	0,616
Fischer's Ratio	0,8	0.012*	1,0	0,953	0,8	0,360
Total Glu-related Amino Acids	1,1	0,530	1,0	0,995	1,0	0,999
Total Pyr-related Amino Acids	0,9	0,536	1,1	0,410	0,9	0,694
Total Acetyl CoA-related Amino Acids	1,0	0,631	0,9	0,651	1,2	0,066
Total Fumarate-related Amino Acids	1,1	0,420	0,8	0,283	1,1	0,670
Total Succinyl CoA-related Amino Acids	0,8	0.029*	0,9	0,595	0,9	0,421
Total Oxaloacetate-related Amino Acids	0,9	0,497	0,6	0.033*	1,1	0,676
Malate/Asp	0,9	0,592	0,5	0,193	0,8	0,551
Citrulline/Ornithine	0,4		1,2	0,726	0,8	0,662
		0.007**				
Glu/2-Oxoglutarate	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
G6P/R5P	0,4	0,225	0,7	0,135	0,9	0,576
SAM/SAH	0,4	0.048*	1,5	0,497	1,1	0,760
Putrescine/Spermidine	2,5	0,207	1,4	0,463	4,7	0,201

N.A. (Not Available): The calculation was impossible because of insufficiency of the data.

¶ The ratio is of computed by using averaged detection values. The latter was used as denominator.

|| The p-value is computed by Welch's t-test. (* < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001)

Supplementary Table 4. Eletronic microscopy analysis of WT and *Tert*^{-/-} mouse livers

	WT RD	WT HFD	<i>Tert</i>^{-/-} RD	<i>Tert</i>^{-/-} HFD
Glycogen rosettes	yes	yes	yes	yes
Lipid droplets	few	large	yes	lots, large
Healthy mitochondria	yes	yes	yes	yes