

## Betaine의 mTOR 비의존적 자가포식 작용 촉진에 의한 표피 분화 유도 효과

최 선 국<sup>†</sup> · 김 미 선 · 김 진 현 · 박 선 규 · 이 천 구 · 강 내 규

(주)LG생활건강 기술연구원  
(2018년 3월 11일 접수, 2018년 3월 22일 수정, 2018년 3월 23일 채택)

### Betaine Induces Epidermal Differentiation by Enhancement of Autophagy through an mTOR-independent Pathway

Seon-Guk Choi<sup>†</sup>, Mi-Sun Kim, Jin-Hyun Kim, Sun Gyoo Park, Cheon Koo Lee, and Nae-Gyu Kang

R&D Center, LG Household & Healthcare Ltd., 175 Gajeong-ro, Youseong-gu, Daejeon 34114, Korea  
(Received March 11, 2018; Revised March 22, 2018; Accepted March 23, 2018)

**요 약:** 표피는 각질형성세포의 분화로부터 재생되어 계층화되는 상피 조직으로서 물리적 장벽을 형성함으로써 다양한 외부 오염원으로부터 개체를 보호한다. 자가포식 작용(autophagy)은 단백질 축적물, 손상된 세포 소기관, 세포내 미생물 등이 리소좀으로 운반되고 분해되도록 매개하는 기작이다. 최근 연구 결과에 의하면 자가포식 작용이 각질형성세포의 대사 기관과 핵을 제거하여 각질층으로 최종 분화하는데 중요한 역할을 하는 것이 보고되었다. 그러나 자가포식 작용을 촉진함으로써 표피 분화를 유도할 수 있는지는 알려져 있지 않다. 본 연구에서는 천연물 유래 단일 화합물 라이브러리를 스크리닝하여 베타인(betaine)이 인간 각질형성세포주인 HaCaT 세포에서 세포질 내 LC3 punctate 소포체 및 LC3-I에서 LC3-II로의 변환을 증가시켜 자가포식 작용을 촉진함을 규명했다. 자가포식 작용의 억제 신호인 mTOR 경로는 베타인에 의해 영향을 받지 않았으므로, 베타인에 의해 유도된 자가포식 작용은 mTOR에 독립적임을 알 수 있었다. 베타인에 의해 촉진되는 자가포식 작용은 primary keratinocyte 및 skin equivalent에서도 관찰되었다. 또한, 베타인 처리된 인공피부에서 표피층 두께가 증가함을 확인하였다. 이러한 결과들로부터, 자가포식 작용의 새로운 조절소재로서 베타인이 표피의 턴오버를 촉진하여 표피의 장벽기능을 개선하고 피부노화를 방지할 수 있음을 시사한다.

**Abstract:** The epidermis which is stratified by epithelial tissue renewal based on keratinocyte differentiation protects the organism from various environmental insults by forming a physical barrier. Autophagy is a mechanism which mediates lysosomal delivery and degradation of protein aggregates, damaged organelles and intracellular microorganisms. Recent reports have shown that autophagy has critical roles for proper terminal differentiation to stratum corneum via removing metabolic organelles and nuclei. However, whether increasing autophagy can activate epidermal differentiation is unknown. Here, we screened a library of natural single compounds and discovered that betaine specifically increased the LC3 positive cytosolic punctate vesicles and LC3-I to LC3-II conversion in HaCaT human keratinocyte cell line, indicating increased autophagy flux. mTOR pathway, which negatively regulates autophagy, was not affected by betaine treatment, suggesting betaine-induced autophagy through an mTOR-independent pathway. Betaine-induced autophagy was also observed in primary human keratinocyte and skin equivalent. Furthermore, epidermal thickness was increased in skin equivalent under betaine treatment. Overall, our finding suggests that betaine as a novel regulator of autophagy may induce epidermal turnover and improve the skin barrier abnormality of the aged epidermis.

**Keywords:** betaine, autophagy, keratinocyte, mTOR, cosmetics

<sup>†</sup> 주 저자 (e-mail: csg24@lgcare.com)  
call: 042)860-8605

## 1. 서 론

표피는 외부의 환경과 항상 접하고 있는 조직으로 주로 외부의 물리적 손상 및 화학물질로부터 인체를 보호하고, 세균, 곰팡이, 바이러스 등이 피부로 침범하는 것을 방지하며, 수분 손실을 막는 보호장벽 역할을 한다. 표피는 기저층, 유극층, 과립층 그리고 최외각층인 각질층으로 구성되며 각질층은 순차적으로 박리되어 떨어지거나 기저막에 위치한 각질형성세포가 비대칭적으로 분열하며 표피 바깥 방향으로 분화하여 표피의 구조적, 기능적 항상성이 유지된다[1]. 최근 들어, 환경오염 등의 이유로 강한 자외선에 노출되는 경우가 많아졌을 뿐만 아니라 미세먼지 등에 의한 염증 반응, 장벽기능의 약화 및 이에 의한 피부의 수분 손실이 증가하면서 피부 노화가 가속화되고, 피부 손상과 관련한 질병의 발병률이 증가하는 추세이다[2,3].

자가포식(autophagy) 작용은 세포 내 스트레스 요인이 과도하게 발생하거나 세포 내 에너지원이 고갈되었을 때 노후 혹은 손상된 세포 내 물질 및 기관을 분해함으로써 손상 물질을 제거하고 에너지를 재생산하는 기작으로서, 여러 상피 조직 뿐만 아니라 표피에서도 자가포식 작용의 활성이 관찰되었다[4,5]. 여러 보고에 의하면, 자가포식 작용은 표피층의 항상성을 유지하여 적절한 피부장벽기능을 발휘하기 위해 필수적이며, 특히 표피층의 바이러스 감염, 자외선에 의한 염증 반응, 멜라노솜 전달 및 각질형성세포의 분화에 중요한 역할을 하며, 각질형성세포가 각질층으로 최종 분화할 때 미토콘드리아, 골지체, 소포체, 핵 등을 제거하는 데 결정적인 역할을 한다[6-11]. 최근 다양한 연구를 통해 노화가 진행될수록 또는 노화를 가속화 시킬수록 세포 내 자가포식 활성이 급격히 감소한다고 보고되고 있으며, 자가포식 작용을 억제시킨 경우 세포 내에 노후 미토콘드리아나 구조가 변성된 단백질 등이 과도하게 축적되어 세포 내 자유 라디칼 및 산화 스트레스가 증가하여 결국에 세포 사멸이 증가하고 노화가 촉진되는 결과를 야기하게 된다. LC3 (Light Chain 3)는 자가포식 작용 시 그 양이 증가하는 단백질로, 이들은 자가포식 작용 과정 동안 전사 후 변형의 과정을 거친다. pro-LC3로 번역된 후 atg4 (autophagy-related protein 4)에 의해 카르복시 말단의 22번째 아미노산의 절단을 통하여 세포질성 형태 LC3-I을 생성시키고, 자

가포식 작용 동안 LC3-I은 atg3 및 atg7이 관여하는 유비퀴틴 유사 시스템으로 인하여 phosphatidylethanolamine (PE)에 의해 지질화(lipidation)되면서 LC3-II로 변환되어 LC3가 자가포식소체에 연결된다. mTOR (mammalian target of rapamycin)는 ser/thr kinase로 ATP 및 아미노산의 변화에 반응하며 영양분의 이용가능성 및 세포 성장의 균형을 맞추는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 충분한 영양분을 공급받을 수 있는 환경에서, mTOR는 class I PI3K/Akt 신호 경로를 통하여 인산화된 후 p70S6 kinase로 양성 신호를 전달하고 eIF4E 저해자인 4E-BP1의 불활성화에 관여하여 특정 mRNA 군의 번역을 야기하며 또한 자가포식 작용을 억제한다[12].

베타인(betaine)은 betaine anhydrous 혹은 trimethylglycine (TMG)로 불리며 생체 내 미토콘드리아에서 콜린의 비가역적인 산화과정을 통해 합성된다. glycine의 질소 원자에 결합된 메틸 그룹을 전달함으로써 methionine을 합성하는데 필수적이기 때문에 일반적 식습관으로써 섭취량이 적은 methionine의 보충제로 많이 사용된다[13]. 또한 베타인은 눈과 피부의 자극을 줄여주는 효과가 있으며, 특유의 양쪽성 전자기적 특성에 기인하여 저자극 계면활성제로서 화장품 원료로 많이 쓰인다[14,15].

본 연구에서는 노화 혹은 외부자극에 의해 감소되는 자가포식 작용의 활성화를 통해 표피 분화를 촉진함으로써 장벽기능을 개선하기 위하여 천연물 유래 단일 화합물 라이브리리로부터 각질형성세포의 자가포식 작용 활성을 촉진하는 화합물을 검색하여 베타인을 찾았다. 또한 *in vitro* 실험을 바탕으로 3D skin model에서 자가포식 작용 활성 촉진 및 표피층 두께를 증가시키는 효능을 확인하였다. 이번 연구를 통해 베타인의 자가포식 작용 활성화를 통한 표피층 강화 기능성 소재로서 활용이 가능한지 알아보고자 하였다.

## 2. 실험방법

### 2.1. 시약 및 기기

실험에 사용한 Betaine (Sigma, USA) 및 선택적 저해제 bafilomycin A1 (Sigma, USA)은 DMSO에 용해 후 사용하였다. 세포 독성은 Cell Counting Kit (CCK-8) (Dojindo Lab, Japan)을 이용하여 판매사에서 제공한 실험법에 따라 측정하였다. 1차 항체(primary antibody)

AKT, p-AKT (ser473), p-S6 (ser240/244), S6 (Cell Signalling Technology, USA)와 LC3B (Novus Biologicals, USA) 및 p62/SQSTM1,  $\alpha$ -Tubulin (Santa Cruz Biotechnology, USA)를 사용하여 western blotting 분석법을 수행하였다.

## 2.2. 표피세포 배양

본 실험에 사용된 사람 피부 유래 각질형성세포 (NHEK-Neo, neonatal normal human epidermal keratinocytes)는 Lonza (192907, USA)에서 구입하였으며 KGM-Gold medium (Lonza, USA)에 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin 50 U/mL, streptomycin 50  $\mu$ g/mL 가 첨가된 배양액 조건에서 배양하였다. 사람 각질형성세포주인 HaCaT (human keratinocyte cell line)은 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin 50 U/mL, streptomycin 50  $\mu$ g/mL 및 0.01 mM CaCl<sub>2</sub>를 포함하는 DMEM (Gibco, USA) 배지에서, 37 °C 5% CO<sub>2</sub>의 조건으로 배양되었다. 세포가 배양용 플라스크에 70-80% 찼을 때 계대배양 하였다.

## 2.3. GFP-LC3 벡터의 도입 및 LC3 puncta 정량

GFP (green fluorescence protein)가 결합된 미세소관 결합 단백질 1 경쇄 3 (LC3) 발현 벡터(Cell Biolabs, USA)를 HaCaT 세포에 유전자 전이 시약 lipofectamine 2000 (Invitrogen, USA)을 이용하여 도입하고, 10% FBS를 포함하는 조건에서 12 h 배양 후 배지에 베타인을 농도별로 처리한 다음, 형광 현미경(Leica Microsystems, USA)으로 평가하였다. 자가포식 작용의 유도를 정량화하기 위하여, 형광 현미경을 이용하여 점형태의 자가포식소체가 형성된(puncta  $\geq$  5) 100개의 GFP 양성 세포를 계수하였다.

## 2.4. Western Blotting 분석법

HaCaT 세포를 60 mm plate에  $8 \times 10^5$  cells 농도로 접종 후, 다음날 베타인을 처리한 후 세포를 5 $\times$  lysis buffer로 용출시켜 단백질을 얻었다. 원심 분리하여 cell debris를 제거하고 BCA protein assay kit (Pierce, USA)를 이용하여 정량 하였다. 세포 추출 단백질을 4-15% SDS-PAGE gel (Bio-Rad, USA)을 이용하여 분리하고 nitrocellulose membrane (Life Technologies, New Zealand)으로 전이시켰다. Membrane을 3% BSA를 함유

한 TBST buffer로 1 h blocking 시킨 후 1차 항체가 포함된 완충용액에 4 °C에서 하루 동안 반응시켰다. Membrane을 TBST로 세척 후 peroxidase가 결합된 2차 항체와 반응 시킨 후 enhance chemiluminescence (Amersham, UK)를 이용하여 발색시키고, Fusion FX 5 image system (Vilber Lourmat, France)으로 immune-reactive band를 확인하였다.

## 2.5. 3D 인공피부 조직배양

Reconstructed human epidermis model (Neoderm-E, Tego Science, Korea)을 6-well plate에 옮겨 2 mL의 growth media (Tego Science, Korea)에 24 h 동안 안정화한 후 베타인이 농도별로 포함된 크림 제형(water, glycerin, propanediol, trehalose, dipropylene glycol, 1,2-hexanediol, trisodium EDTA, ethanol, PEG-40 hydrogenated castor oil, carbopol, acrylates/c10-30 alkyl acrylate crosspolymer, tromethamine, hydrogenated polydecene, fragrance)을 인공피부 위에 도포하였다. 24 h 동안 배양 후 Phosphate buffer saline (PBS)로 인공피부 위에 도포된 베타인 크림을 세척해 준 뒤 protease inhibitor cocktail (ThermoFisher Scientific, USA)이 포함된 RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP-40)로 sonication 하여 조직을 파쇄하였다. 조직 추출단백질은 western blot 수행하여 조직 내 각질형성 세포의 자가포식 작용 활성도를 분석하였으며, 인공피부 위에 베타인 1% 크림 도포하고 1주일 후 H&E staining 진행하였다.

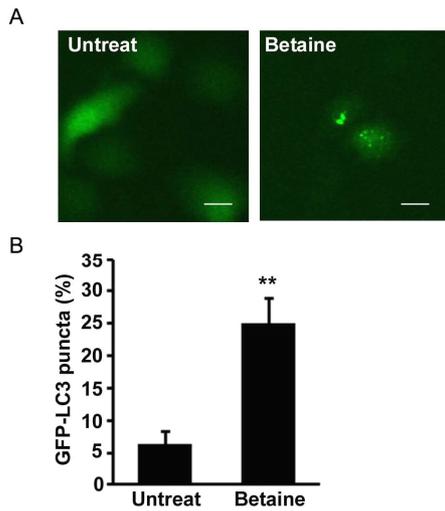
## 2.6. 통계적 분석

모든 결과값은 3번의 독립적인 실험을 통한 평균  $\pm$  표준편차(means  $\pm$  SEM)로 나타냈으며, 통계처리는 SPSS를 이용한 student's *t*-test를 통하여 *p*-value를 산출하였다. *p*-value가 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 각질형성세포 내 자가포식 작용 활성화 소재 스크리닝

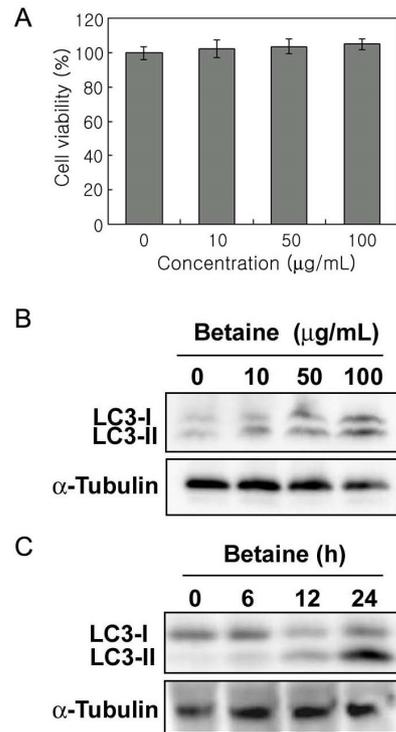
천연물 유래 단일 화합물 라이브러리에서 자가포식 작용을 촉진시켜 주는 효능 소재를 찾기 위하여, 자가포식 작용이 유도될 때 막 결합 형태로 변환되는 LC3



**Figure 1.** Increase of autophagic puncta by treatment with betaine (A, B) HaCaT cells were transfected with GFP-LC3 before betaine-treatment for 12 h. The cells were imaged using a fluorescence microscope (A), and the GFP-LC3 puncta were counted (B). Bar = 10  $\mu$ m. The results were obtained from three independent experiments with at least 100 cells analyzed. \*\* $p < 0.001$  versus un-treated control.

에 GFP (green fluorescent protein)가 결합되어 세포질 내 GFP-LC3의 점(puncta) 형태 소포체가 증가한 세포 숫자를 비교하였으며, 베타인 처리 시 GFP-LC3 puncta가 증가한 세포수가 무처리군에 비해 18.75% 정도 증가한 것을 확인하였다(Figure 1A, B).

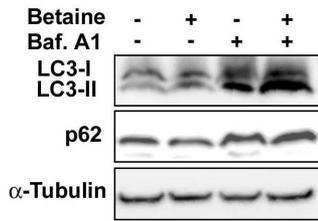
**3.2. 베타인의 각질형성세포 내 자가포식 작용 촉진 효능**  
이 결과를 생화학적 방법을 이용하여 증명해 보고자, 자가포식소체(autophagosome)의 2중막 사이에 들어가면서 변환된 LC3-II의 생성 정도를 western blotting으로 확인하였다[16]. HaCaT 세포에 베타인을 10, 50, 100  $\mu$ g/mL 처리했을 때, 어떠한 농도에 대해서도 세포 독성이 나타나지 않았다(Figure 2A). 이어 베타인을 위 실험과 같은 농도로 처리했을 때 농도가 증가할수록 LC3-II의 양이 증가함을 확인하였다(Figure 2B). 또한, 50  $\mu$ g/mL의 베타인을 처리하여 시간별 LC3-II 변환 양을 관찰하였을 때, 6 h까지 유의한 증가는 보이지 않았으나 12 h부터 증가하여 24 h에 가장 많이 변환되는 것을 확인하였다(Figure 2C).



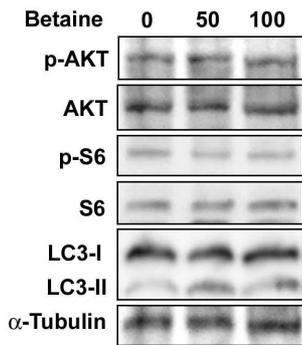
**Figure 2.** Increase of autophagy activity by treatment with betaine (A) HaCaT cells were treated various concentrations of betaine and the viability was determined by CCK-8. (B, C) HaCaT cells were treated with or without different doses (B) of betaine for indicated hours and the cell lysates were subjected to western blotting (C).

### 3.3. 베타인에 의한 자가포식소체 합성 촉진

자가포식소체의 세포 내 증가는 크게 두 가지 원인으로 나타날 수 있는데, 이는 1) 자가포식소체 생성에 관련된 여러 신호전달과정의 활성화, 혹은 2) 자가포식소체는 최종적으로 리소솜과 합쳐져 소포체 내 단백질이 분해되어 재활용되는데, 리소솜의 기능적 결합에 의한 분해과정의 문제에 의해 축적될 수 있다. 베타인 처리에 의한 자가소화소체의 증가가 어떤 기전으로 일어나는지 규명하기 위해 리소솜 활성 저해제로 알려진 bafilomycin A1 (Baf. A1)을 베타인과 같이 처리했을 때, 베타인 단독 처리했을 때보다 LC3-II의 양이 더욱 증가하는 것을 관찰함으로써 베타인에 의해 형성되는 자가소화소체는 리소솜을 통한 분해과정이 정상적으로 일어나고 있음을 확인하였다(Figure 3). 또한, 자가포식 작용에 의해 분해된다고 알려진 p62/SQSTM1 (p62) 단백질 역시 베타인에 의해 양이 감소함을 확인



**Figure 3.** Betaine increased autophagic flux. HaCaT cells were treated with or without 50  $\mu\text{g/mL}$  of betaine for 12 h in the presence or absence of 20 nM bafilomycin A1 (Baf. A1) of last 2 h and cells were subjected to western blot analysis.

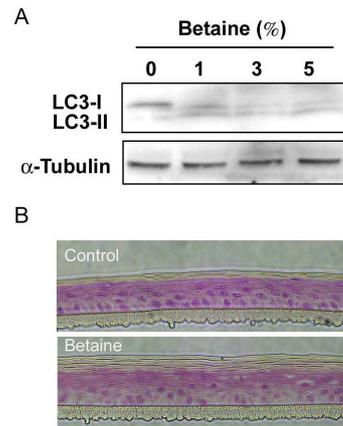


**Figure 4.** Betaine induces autophagy via mTOR-independent mechanism. HaCaT cells were treated with indicated doses of betaine for 12 h and the cell lysates were subjected to western blot analysis.

함으로써 리소솜에 의한 기질 분해가 정상적으로 작동되고 있음을 확인하였다.

**3.4. 베타인의 mTOR 경로 독립적 자가포식 작용 활성화 기작**

다음으로 베타인에 의해 자가포식 작용이 촉진되는 기전을 찾기 위해 관련 상위 신호조절 인자를 규명하는 실험을 수행하였다. 이전 연구에서, betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT)에 의해 베타인 의존적으로 homocysteine의 양이 줄어들며, 한 연구에 의하면 homocysteine이 자가포식 작용 억제 효소인 mTORC1의 활성을 촉진한다고 보고된 바 있다[17,18]. 베타인에 의해 mTORC1의 활성이 조절되는지 보기 위해, 베타인 처리 후 Akt-mTOR-S6 경로의 인산화 정도를 확인하였다. 그 결과 HaCaT 세포에서 베타인 처리에 의해 mTOR 신호의 유의한 차이를 볼 수 없었으며, 이는



**Figure 5.** Betaine increases epidermal thickness in 3D skin model. (A) 3D skin was treated with indicated doses of betaine cream and tissue were subjected with western blot analysis. (B) Epidermal thickness was measured by H&E staining. 3D skin was treated with 1% of betaine cream for 7 days.

**Table 1.** Increased epidermal thickness in 3D skin model by treatment with betaine. \* $p < 0.01$  versus control

	Epidermal thickness ( $\mu\text{m}$ )	S.D.	Control 대비
Control	62	4.26	1.00
Betaine	74*	4.78	1.19

베타인에 의한 자가포식작용 촉진이 mTOR 신호와 독립적으로 일어남을 규명하였다(Figure 4).

**3.5. 3D Skin Model에서의 표피두께 증가 효과**

이전 연구결과에 따르면, 자가포식 작용 촉진에 의해 각질형성세포의 분화가 촉진되는 것을 *in vitro* 상에서 확인하였다[19,20]. 베타인의 자가포식 작용 촉진 효능에 의해 표피 내 분화가 촉진되는지 확인하기 위하여 최근 동물 실험 대체법으로써 주목되는 3D skin model을 이용하였다. 먼저, 베타인 1%, 3%, 5%를 크림 제형으로 만들어 각질 위에 도포한 뒤 24 h 후 표피 내 자가포식 작용이 촉진되었는지 확인하였다. 실험 결과 베타인 1% 처리에 의해 자가포식 작용이 증가하였으며 그 이상의 농도에서 더 증가하지 않았다(Figure 5A). 다음으로 베타인 1% 크림을 인공피부에 도포 후 피부 조직을 H&E 염색하여 표피 두께 변화를 측정하였다. 그 결과, betaine 1% 처리에 의해 표피 두께가 19% 증가함을 확인하였다(Figure 5B, Table 1).

#### 4. 결 론

자가포식 작용은 생체 내 다양한 스트레스로부터 세포의 항상성과 기능을 유지하기 위해 필수적으로 일어나는 기작으로, 표피 내에서 작동하여 다양한 내, 외부 스트레스 및 감염의 위험을 낮추고 각질형성세포의 분열과 분화에 중요한 역할을 한다. 본 연구에서 노화 및 유전적, 환경적 요인에 의해 결함이 생기는 표피층의 장벽기능 개선을 위해 천연물 유래 단일 화합물 라이브리리에서 자가포식 작용 활성화 소재를 스크리닝 하였다. 그 결과, 베타인 처리 시 각질형성세포 내 자가포식소체 마커인 LC3 puncta를 증가시키는 것을 확인하였다. 또한, 베타인에 의한 자가포식 작용의 증가는 처리농도 혹은 시간에 의존적으로 그 효능이 증가하며, 이때 리소솜은 정상적으로 기능하는 것으로 보아 자가포식소체의 분해가 정체된 것이 아님을 확인하였다.

한편, 이전 연구에서 apigenin 및 efavirenz에 의해 각질형성세포에서 자가포식 작용이 유도되며 이는 mTOR 신호에 의존적임을 보고하여 각질형성세포에서 자가포식 작용의 활성화에 mTOR 인산화가 중요한 역할을 하고 있음을 시사하였다. 그러나 이번 연구에서 베타인에 의한 자가포식 작용 활성화는 mTOR에 독립적임을 확인하였으며, Xu *et al.*의 연구에서 trehalose 역시 mTOR에 비의존적으로 자가포식 작용을 활성화시키는 것이 보고되어 각질형성세포에서의 mTOR 독립적인 자가포식 작용 활성화 기작에 대해 추가 연구가 필요하다[20-22].

앞서 *in vitro* 결과를 바탕으로 베타인에 의한 자가포식 작용 촉진 효과에 대해 3D skin model을 이용한 자가포식 작용 촉진 및 표피 두께 증가 효과를 평가하였다. 그 결과, 베타인 1% 농도 처리 시 표피 내 자가포식 작용이 활성화됨을 확인하였다. 이때, 농도 의존적인 자가포식 작용 활성화는 보이지 않았으며 이는 베타인의 높은 solubility (50 mg/mL)로부터 기인한 피부 투과도의 한계 때문인 것으로 보이나 이는 추후 실험적인 검증이 필요하다. 이후 각질을 투과한 베타인은 각질형성세포 내로 흡수된 후 표피 분화를 촉진하여 표피층의 두께가 증가된 것을 알 수 있었다.

이상의 결과를 통해 베타인은 각질형성세포의 자가포식 작용을 증가시킬 수 있으며, 3D skin model에서

표피 분화를 촉진할 수 있음을 확인하였다. 따라서 장벽기능 결손에 의한 피부 질환 혹은 노화에 의해 얇아지는 표피층의 강화를 위한 기능성 소재로서의 활용이 가능하다고 판단된다.

#### Reference

1. P. A. Sotiropoulou and C. Blanpain., Development and homeostasis of the skin epidermis, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **4**(7), a008383 (2012).
2. N. D. Magnani, X. M. Muresan, G. Belmonte, F. Cervellati, C. Sticozzi, A. Pecorelli, C. Miracco, T. Marchini, P. Evelson, and G. Valacchi, Skin damage mechanisms related to airborne particulate matter exposure, *Toxicol. Sci.*, **149**(1), 227 (2016).
3. R. R. Wickett and M. O. Visscher, Structure and function of the epidermal barrier, *Am. J. Infect. Control.*, **34**(10), S98 (2006).
4. R. M. Lavker and A. G. Matoltsy, Formation of horny cells: the fate of cell organelles and differentiation products in ruminal epithelium, *J. Cell. Biol.*, **44**(3), 501 (1970).
5. R. M. Lavker, Horny cell formation in the epidermis of *Rana pipiens*, *J. Morphol.*, **142**(4), 365 (1974).
6. O. Akinduro, K. Sully, A. Patel, D. J. Robinson, A. Chikh, G. McPhail, K. M. Braun, M. P. Philpott, C. A. Harwood, and C. Byrne, Constitutive autophagy and nucleophagy during epidermal differentiation, *J. Invest. Dermatol.*, **136**(7), 1460 (2016).
7. M. Moriyama, H. Moriyama, J. Uda, A. Matsuyama, M. Osawa, and T. Hayakawa, BNIP3 plays crucial roles in the differentiation and maintenance of epidermal keratinocytes, *J. Invest. Dermatol.*, **134**(6), 1627 (2014).
8. Y. Zhao, C. F. Zhang, H. Rossiter, L. Eckhart, U. Konig, S. Karner, M. Mildner, V. N. Bochkov, E. Tschachler, and F. Gruber, Autophagy is induced by UVA and promotes removal of oxidized phospholipids and protein aggregates in epidermal keratinocytes, *J. Invest. Dermatol.*, **133**(6), 1629 (2013).

9. L. Qiang, C. Wu, M. Ming, B. Viollet, and Y. Y. He, Autophagy controls p38 activation to promote cell survival under genotoxic stress, *J. Biol. Chem.*, **288**(3), 1603 (2013).
10. I. Hurbain, M. Romao, P. Sextius, E. Bourreau, C. Marchal, F. Bernerd, C. Duval, and G. Raposo, Melanosome distribution in keratinocytes in different skin types: melanosome clusters are not degradative organelles, *J. Invest. Dermatol.*, **138**(3), 647 (2018).
11. L. M. Griffin, L. Cicchini, and D. Pyeon, Human papillomavirus infection is inhibited by host autophagy in primary human keratinocytes, *Virology*, **437**(1), 12 (2013).
12. K. H. Kim and M. S. Lee, Autophagy—a key player in cellular and body metabolism, *Nat. Rev. Endocrinol.*, **10**(6), 322 (2014).
13. S. Davidson, B. A. Hopkins, J. Odle, C. Brownie, V. Fellner, and L. W. Whitlow, Supplementing limited methionine diets with rumen-protected methionine, betaine, and choline in early lactation holstein cows, *Journal of Dairy Science.*, **91**(4), 1552 (2008).
14. M. T. Kidd, P. R. Ferket, and J. D. Garlich, Nutritional and osmoregulatory functions of betaine, *World's Poultry Science Journal*, **53**(2), 125 (2007).
15. E. S. Basheva, S. Stoyanov, N. D. Denkov, K. Kasuga, N. Satoh, and K. Tsujii, Foam boosting by amphiphilic molecules in the presence of silicone oil, *Langmuir*, **17**(4), 969 (2001).
16. N. Mizushima, T. Yoshimori, and B. Levine, Methods in mammalian autophagy research, *Cell*, **140**(3), 313 (2010).
17. K. Khayati, H. Antikainen, E. M. Bonder, G. F. Weber, W. D. Kruger, H. Jakubowski, and R. Dobrowolski, The amino acid metabolite homocysteine activates mTORC1 to inhibit autophagy and form abnormal proteins in human neurons and mice, *The FASEB Journal*, **31**(2), 598 (2017).
18. Q. Feng, K. Kalari, B. L. Fridley, G. Jenkins, Y. Ji, R. Abo, S. Hebring, J. Zhang, M. D. Nye, J. S. Leeder, and R. M. Weinshilboum, Betaine-homocysteine methyltransferase: human liver genotype-phenotype correlation, *Molecular genetics and metabolism*, **102**(2), 126 (2011).
19. E. Aymard, V. Barruche, T. Naves, S. Bordes, B. Closs, M. Verdier, and M. H. Ratinaud, Autophagy in human keratinocytes: an early step of the differentiation?, *Exp. Dermatol.*, **20**(3), 263 (2011).
20. Q. Dong, J. E. Oh, J. K. Yi, R. H. Kim, K. H. Shin, R. Mitsuyasu, N. H. Park, and M. K. Kang, Efavirenz induces autophagy and aberrant differentiation in normal human keratinocytes, *Int. J. Mol. Med.*, **31**(6), 1305 (2013).
21. B. B. Bridgeman, P. Wang, B. Ye, J. C. Pelling, O. V. Volpert, and X. Tong, Inhibition of mTOR by apigenin in UVB-irradiated keratinocytes: A new implication of skin cancer prevention, *Cellular signaling*, **28**(5), 460 (2016).
22. X. Chen, M. Li, L. Li, S. Xu, D. Huang, M. Ju, J. Huang, K. Chen, and H. Gu, Trehalose, sucrose and raffinose are novel activators of autophagy in human keratinocytes through an mTOR-independent pathway, *Sci. Rep.*, **6**, 28423 (2016).