

## Original Article

Int J Oral Biol 46:134-139, 2021  
 pISSN: 1226-7155 • eISSN: 2287-6618  
<https://doi.org/10.11620/IJOB.2021.46.3.134>

# Regulation of the expression and function of TRPCs and Orai1 by Homer2 in mouse pancreatic acinar cells

Jung Yun Kang<sup>1,2†</sup>, Namju Kang<sup>1†</sup>, and Yu-Mi Yang<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Oral Biology, BK21 PLUS Project, Yonsei University College of Dentistry, Seoul 03722, Republic of Korea

<sup>2</sup>Department of Dental Hygiene, College of Software Digital Healthcare Convergence, Yonsei University, Wonju 26493, Republic of Korea

Under physiological conditions, calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) regulates essential functions of polarized secretory cells by the stimulation of specific  $\text{Ca}^{2+}$  signaling mechanisms, such as increases in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) via the store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry (SOCE) and the receptor-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry (ROCE). Homer proteins are scaffold proteins that interact with G protein-coupled receptors, inositol 1,4,5-triphosphate ( $\text{IP}_3$ ) receptors, Orai1-stromal interaction molecule 1, and transient receptor potential canonical (TRPC) channels. However, their role in the  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in exocrine cells remains unknown. In this study, we investigated the role of Homer2 in the  $\text{Ca}^{2+}$  signaling and regulatory channels to mediate SOCE and ROCE in pancreatic acinar cells. Deletion of *Homer2* (*Homer2*<sup>-/-</sup>) markedly increased the expression of TRPC3, TRPC6, and Orai1 in pancreatic acinar cells, whereas these expressions showed no difference in whole brains of wild-type and *Homer2*<sup>-/-</sup> mice. Furthermore, the response of  $\text{Ca}^{2+}$  entry by carbachol also showed significant changes to the patterns regulated by specific blockers of SOCE and ROCE in pancreatic acinar cells of *Homer2*<sup>-/-</sup> mice. Thus, these results suggest that Homer2 plays a critical role in the regulatory action of the  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  via SOCE and ROCE in mouse pancreatic acinar cells.

**Keywords:** Calcium signaling, Acinar cells, Homer scaffolding proteins, Physiological phenomena


## Introduction

세포 내 칼슘 이온은 이차 메신저로서 근육 수축, 신경전달물질 분비, 혈액 분비, 세포 외 배출 같은 활동에 중요한 역할을 담당한다[1,2]. 특히, 췌장의 선세포(acinar cell)에서 inositol 1,4,5-triphosphate ( $\text{IP}_3$ ) 수용체와 ryanodine 수용체의 발견, 세포질그물망(endoplasmic reticulum, ER)의 내강을 통한 칼슘의 이동, 그리고 칼슘 신호전달 관련 채널 또는 단백질의 분포 및 이들 간의 상호작용 규명 등과 같은 칼슘 신호전달의 중요 개념들이 규명됐다[1-3]. 칼슘의 세포 내 유입은 다음과 같이 구분된다. 첫 번째, 저장고-의존성 칼슘 유입(store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry)은 ER의 칼슘 고갈에 의해 stromal interaction molecule

1 (Stim1)과 Orai 채널, 그리고 transient receptor potential canonical (TRPC) 채널들이 클러스터를 형성하여 활성화된다. 두 번째, 수용체-의존성 칼슘 유입(receptor-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry)은 무스카린 작용제인 아세틸콜린 또는 carbachol (CCh)과 같은 작용제가 G 단백질 결합 수용체(G protein-coupled receptor, GPCR)의 G 단백질에 결합하여 phospholipase C (PLC)에 의해 활성화되는 TRPC 채널들(TRPC4, TRPC5) 및 PLC 활성화 후 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate로부터 생성된 diacylglycerol (DAG)에 의해 활성화되는 TRPC 채널들(TRPC3, TRPC6, TRPC7)의 활성화에 의해 나타난다[2-5].

칼슘의 세포 내 유입과 관련된 GPCR 중 일부는 스캐폴드 단백질인 Homer 그룹의 단백질들과 결합할 수 있는 결합 모티프를 가지며, Hom-

Received September 1, 2021; Revised September 7, 2021; Accepted September 7, 2021

\*Correspondence to: Yu-Mi Yang, E-mail: ymyang@yuhs.ac  <https://orcid.org/0000-0002-6228-9044>

†Jung Yun Kang and Namju Kang contributed equally to this work.

Copyright © The Korean Academy of Oral Biology

© This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

er1, Homer2, Homer3로 분류된다. 이들 중 짧은 형태의 Homer1a는 신경세포에서 지속적 자극에 의해 직접적으로 발현되는 초기 유전자 산물이고[6], Homer1a를 제외한 모든 Homer 단백질들은 긴 형태로 이루어져 있으며, 중추신경계에 고르게 발현되어 있다. Homer 단백질들은 N-말단에 Ena/VASP homology 1 (EVH1) 단백질 결합 도메인과 C-말단에 coiled-coil 복합(multimerization) 도메인, 그리고 류신 지퍼(leucine zipper)로 구성된다. 특히, EVH1 도메인은 일부 GPCR들, TRPC 채널들,  $IP_3$  수용체들, ryanodine 수용체들, 그리고 스캐폴드 단백질인 Shank 그룹 등과 결합하는 것으로 알려져 있다[7,8]. 이러한 Homer 단백질은 신경 세포에서 시냅스 활성을 조절하는 시냅스 단백질로 알려졌으나[6,7], 이후 비활성 세포에서의 연구들을 통해 Homer1은 TRPC 채널과  $IP_3$  수용체들의 결합을 도와 칼슘 유입을 조절하고[9], Homer2는 췌장의 선세포에서 G 단백질과 PLC 활성 조절을 통해 GPCR들의 칼슘 신호 유발 자극 강도를 조절하며[10], 이하선 선세포에서도 아밀라아제 분비와 관련한 칼슘 신호 유발 자극의 강도를 조절[11]할 뿐만 아니라, plasma membrane  $Ca^{2+}$ -ATPase (PMCA)와 결합을 통해 세포 내 칼슘 농도( $[Ca^{2+}]_i$ )를 조절한다[12]는 것이 밝혀졌다. 또한, 골격근에서 Homer2는 근세포 분화과정 동안 ryanodine 수용체를 통한 칼슘 분비 증가에 의해 nuclear factor of activated T cells type c1 (NFATc1)-의존적 신호전달 경로를 활성화시키고[13], Homer2와 Homer3가 T 림프구와 파골세포에서 calcineurin과 경쟁적으로 NFAT에 결합하여 T 세포의 활성[14] 및 파골세포 분화 조절에 관여한다[15,16]는 것이 밝혀졌다. 그럼에도 불구하고, 분비 조직에서 Homer 단백질과 세포 내 칼슘 유입에 관여하는 수용체들 간의 상호 연관성 및 칼슘 신호 유발과정에서 Homer 단백질들의 역할은 여전히 명확히 알려져 있지 않다. 본 연구에서는 *Homer2* 유전자 제거(*Homer2*<sup>-/-</sup>) 마우스를 이용하여 췌장 선세포에서 저장고- 및 수용체-의존적 칼슘 유입을 매개하는 채널들에 대한 Homer2의 역할 및 이들과의 상호작용을 통한 Homer2의 칼슘 신호 조절기전에 대한 영향을 알아보려고 하였다.

## Materials and Methods

### 1. 재료

Fura-2-acetoxymethyl ester (Fura-2/AM)는 Molecular Probes (Eugene, OR, USA)에서 bovine serum albumin (BSA)과 pyruvic acid는 Amresco (Solon, OH, USA)에서 구입하였다. Collagenase type IV, carbamyl choline chloride (carbachol), soybean trypsin inhibitor, N-[2-hydroxyethyl] piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid] (HEPES), gadolinium chloride와 D-glucose는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, 2-aminoethoxydiphenyl borate (2APB)와 SKF96365는 Tocris Bioscience (Bristol, UK)에서 구입하였다.

### 2. 실험동물

대조군과 *Homer2* 유전자 제거(*Homer2*<sup>-/-</sup>) 마우스는 선행 연구에서 제작/사용되었던 실험동물(25-28 g)을 사용하였다[10-12]. 모든 실험동물들은 연세대학교 치과대학 동물실에서 12시간 주/야 순환 주기와 일정한 온도, 습도를 유지하면서 사료와 물을 자유로이 공급하며 사육되었고, 연세대학교 실험동물 윤리위원회(ACUC 승인 번호 2010-0211)의 윤리규정에 따라 실험하였다.

### 3. 췌장의 선세포 분리

췌장의 선세포 분리는 콜라게네이즈 분해법(collagenase digestion)을 이용하여 선행연구에서 사용된 방법을 응용하여 실시하였다[12]. 분리된 세포는 생리식염수(140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 10 mM glucose, 310 mOsm, pH 7.4 with NaOH)에 0.1% BSA와 0.02% soybean trypsin inhibitor를 첨가한 solution A에 담근 후 사용할 때까지 얼음에 보관하였다.

### 4. 중합효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction, PCR) 분석

총 RNA는 Trizol 시약(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 사용하여 제조사의 지시에 따라 분리한 후, Accu-Power RT PreMix (BIONEER, Daejeon, Korea)를 사용하여 역전사(reverse transcriptase) PCR을 통해 cDNA를 획득하였다. 합성된 cDNA는 HiPi™ PCR PreMix (Elpis, Busan, Korea)와 다음의 primer 세트를 사용하여 제조사의 지시에 따라 PCR로 DNA를 증폭하였다. *Actin* (F) 5'-TTTGATGTCACGCACGATTTC-3' (R) 5'-TGTGATGGTGGGAATGGGTCAG-3'; *TRPC1* (F)S 5'-ATGAGAAGCTTTTCTTGCTG-3' (R) 5'-ATGAGAAGCTTTTCTTGCTG-3'; *TRPC3* (F) 5'-GACATATTCAAGTTCATGGTTCTC-3' (R) 5'-ACATCACTGTCATCCTCGATCTC-3'; *TRPC4* (F) 5'-CTGCAGATATCTCTGGGAAG-3' (R) 5'-GTCGGCAATTAGTTGTGAAG-3'; *TRPC6* (F) 5'-GCTGCTACTCAAGAAGGAAA-3' (R) 5'-ACCTTTGTATGCATTGATCC-3'; *Orai1* (F) 5'-TGCTCTGCTGGTCAAGTTC-3' (R) 5'-CCAGTGGGAAGGTGAGGACT-3'; *Stim1* (F) 5'-CCAGAGTCTCAGCCATAGTC-3' (R) 5'-AGCCACTGTATCACCTCATC-3'; *mGluR5* (F) 5'-CCCCAAACTCTCCAGTCT-3' (R) 5'-ATTTTTCACCTCGGGTTC-3'. PCR 산물은 1.5% agarose 겔에서 분리되었다. 모든 실험자료의 분석은 ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)를 이용하였다.

### 5. $[Ca^{2+}]_i$ 측정

$[Ca^{2+}]_i$ 의 변화를 측정하기 위하여 대조군과 *Homer2*<sup>-/-</sup> 마우스에서

분리한 췌장 선세포는 생리식염수에서 5  $\mu$ M Fura-2/AM과 0.05% pluronic F-127를 60분간 처리하였다. Fura-2의 형광은 Molecular Devices (Downingtown, PA, USA) 이미징 시스템을 이용하였으며, 이때 파장은 excitation 파장(340 nm와 380 nm)과 emission 파장 (510 nm)을 사용하여 형광의 변화를 측정하였다(Ratio =  $F_{340}/F_{380}$ ). Fura-2의 형광 변화 이미지는 도립 현미경 (inverted microscope, Nikon Instruments Inc., Tokyo, Japan)에 부착된 CCD 카메라 (Photometrics, Tucson, AZ, USA)를 통하여 컴퓨터에서 2초 간격으로 기록하였다. 모든 실험자료의 분석은 MetaFluor software (Molecular Devices)를 이용하였다.

## 6. 실험자료의 통계 분석

모든 실험자료의 수치 값은 평균값  $\pm$  표준오차(mean  $\pm$  standard error)로 표시하였다. 각 수치 값의 통계적 유의성 검증은 독립 t-test를 시행하였으며,  $p < 0.05$ 에서 통계적으로 유의하다고 평가하였다.

## Results

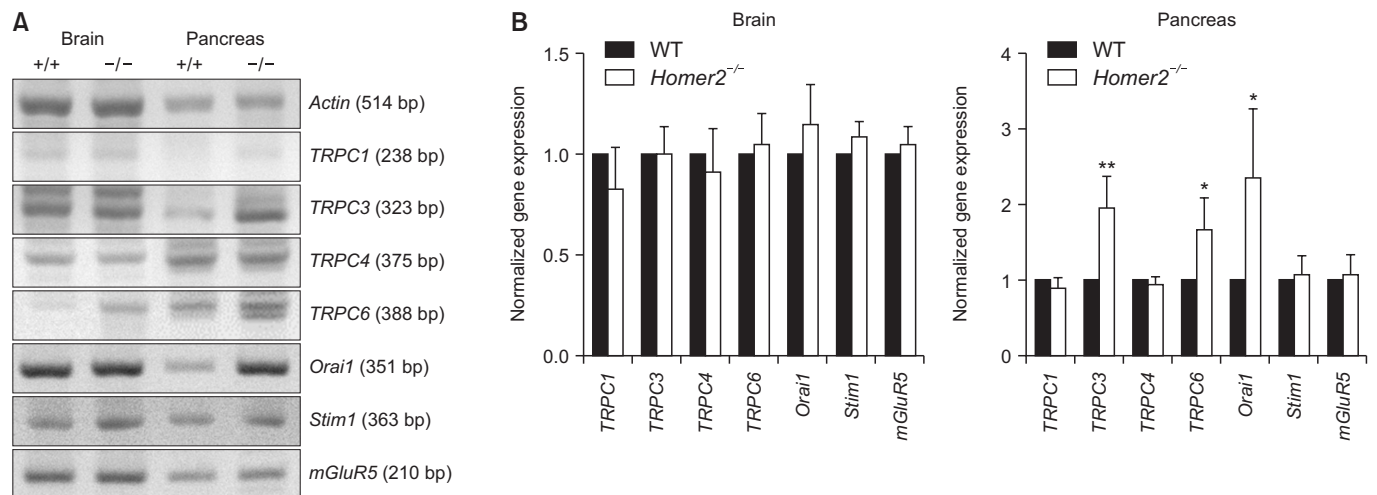
### 1. 칼슘 유입을 매개하는 채널들의 발현 양상

이전의 연구들에서 *Homer2*<sup>-/-</sup> 마우스의 췌장과 이차선 선세포에서 *Homer2* 유전자의 결여는 칼슘 신호 관련 단백질들의 발현 변화 및 GPCR 작용제에 대한 칼슘 신호의 변화를 유발하였다[10-12]. 이에 대조군과 *Homer2*<sup>-/-</sup> 마우스의 뇌 조직과 췌장 선세포에서 얻은 cDNA를 이용하여 PCR을 통해 칼슘 유입을 매개하는 것으로 알려진 채널들의 발현 변화를 확인하였다(Fig. 1A). 뇌 조직에서 칼슘 유입 매개 채널

들의 발현 양상은 대조군과 *Homer2*<sup>-/-</sup> 마우스 모두에서 비슷하게 관찰된 반면, *Homer2*<sup>-/-</sup> 마우스의 췌장 선세포에서 TRPC3와 TRPC6 및 Orai1의 발현이 현저히 증가된 것을 확인하였다(Fig. 1B). 이러한 결과들은 *Homer2* 단백질의 발현이  $[Ca^{2+}]_i$ 의 조절에 관여하는 채널들과 밀접한 연관성이 있음을 시사한다.

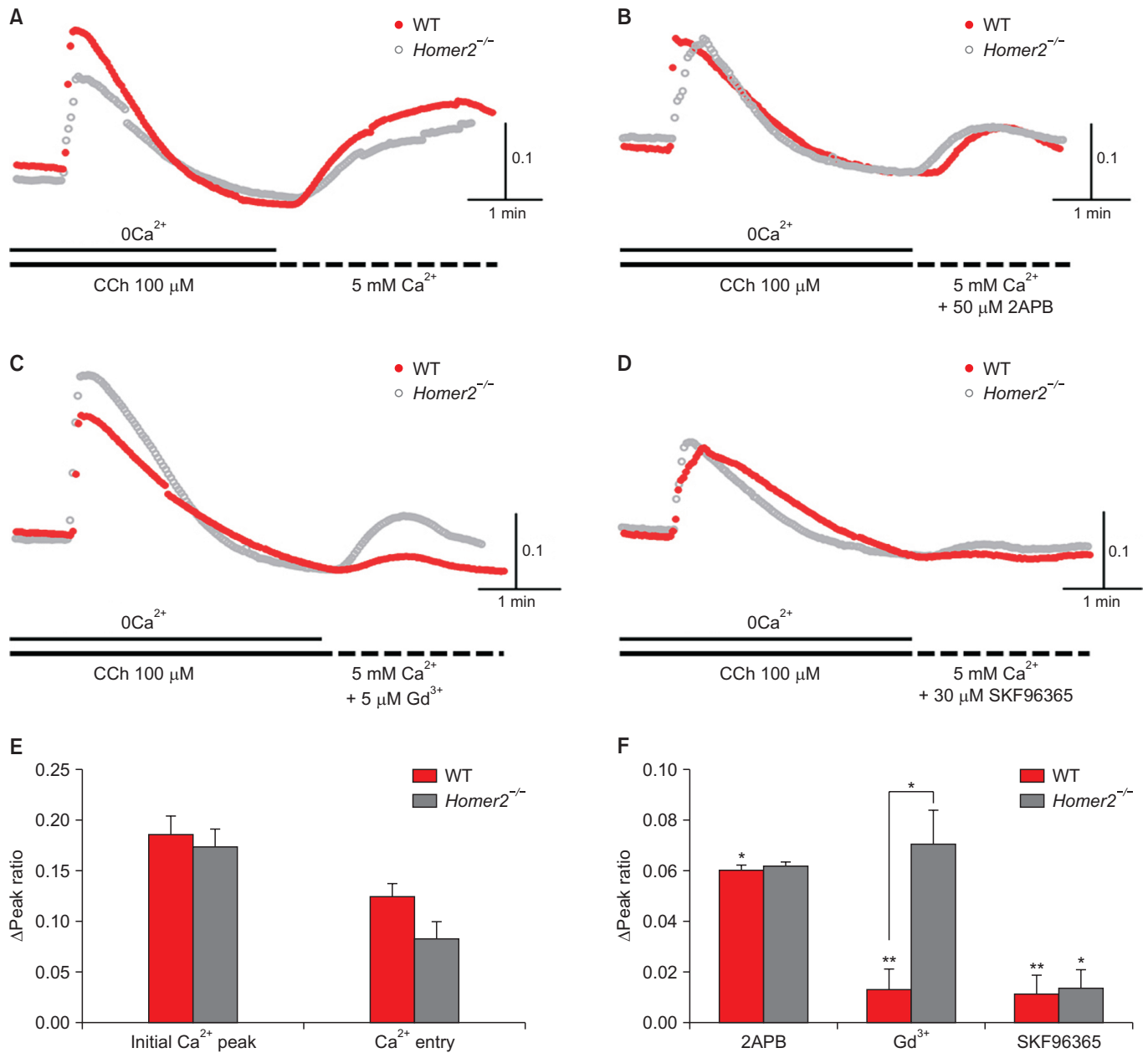
### 2. 특정 억제제에 의한 수용체-의존성 칼슘 유입의 조절 변화

*Homer2* 단백질 발현 억제에 따른 췌장 선세포에서의 수용체-의존성 칼슘 유입 조절에 대한 영향을 조사하였다. 대조군과 *Homer2*<sup>-/-</sup> 마우스의 췌장에서 분리된 선세포에 외부 칼슘이 없는 환경에서 100  $\mu$ M carbachol 자극에 의해  $[Ca^{2+}]_i$  (initial  $Ca^{2+}$  peak)의 증가 후 5 mM 외부 칼슘 자극에 의해 세포 내로 유입되는  $[Ca^{2+}]_i$  ( $Ca^{2+}$  entry)를 측정하였다. 그 결과, 대조군과 *Homer2*<sup>-/-</sup> 마우스에서 수용체-의존성 칼슘 유입의 반응 크기는 유사하게 나타나는 것을 확인하였다(Fig. 2A and 2E). 다음으로 5 mM 외부 칼슘 자극에 의한  $[Ca^{2+}]_i$  증가 효과에 대하여 칼슘 유입 매개 채널들에 작용하는 특정 억제제를 사용하여 수용체-의존성 칼슘 유입의 변화를 조사하였다. 5 mM 외부 칼슘 자극과 함께 IP<sub>3</sub> 수용체와 저장고-의존성 칼슘 유입 작용을 저해하는 것으로 알려진 2APB를 처리한 후  $[Ca^{2+}]_i$ 를 측정한 결과, Fig. 2A와 2E의 결과와 비교해서 2APB에 의한 대조군의 칼슘 유입 반응은 유의하게 감소하였다. 그러나, 대조군과 *Homer2*<sup>-/-</sup> 마우스의 췌장 선세포에서 나타난 2APB에 대한  $[Ca^{2+}]_i$  반응에 대해 두 그룹 간의 유의성은 확인할 수 없었다(Fig. 2B and 2F). 반면, TRPC3, TRPC6, 또는 TRPC7 채널 매개 수용체-의존성 칼슘 유입에 작용하는 gadolinium ( $Gd^{3+}$ )을 처리한 후, *Homer2*<sup>-/-</sup> 마우스의 췌장 선세포에서 나타나는  $[Ca^{2+}]_i$  반응은 대조군과 비교해서  $Gd^{3+}$ 의 영향이 없이 뚜렷한  $[Ca^{2+}]_i$  증가가 나타남을 확인



**Fig. 1.** The expression of  $Ca^{2+}$  entry mediated channels changes in pancreatic acinar cells from wild-type (WT) and *Homer2*<sup>-/-</sup> mice (n = 5). (A) Basal expressions of transient receptor potential canonical (TRPC) channels, Orai1, stromal interaction molecule 1 (Stim1), and metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) were identified by PCR in whole brain and pancreatic acinar cells from WT and *Homer2*<sup>-/-</sup> mice. (B) Pancreatic acinar cells were significantly presented the activated expression of TRPC3 (1.94  $\pm$  0.19), TRPC6 (1.66  $\pm$  0.18) and Orai1 (2.34  $\pm$  0.41) in *Homer2*<sup>-/-</sup> mice. Bar graphs show normalized expression to that of the actin expression. Data are presented as mean  $\pm$  standard error.

\* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  compared to WT cells.



**Fig. 2.** The inhibitory effect of various blockers for carbachol (CCh)-activated receptor-operated Ca<sup>2+</sup> (ROC) channels in pancreatic acinar cells from wild-type (WT) and *Homer2*<sup>-/-</sup> mice (n = 4). (A) Application of 100 μM CCh increased a [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in Ca<sup>2+</sup>-free environments (initial Ca<sup>2+</sup> peak, WT 0.185 ± 0.020; *Homer2*<sup>-/-</sup> 0.173 ± 0.019) and changes of the Ca<sup>2+</sup> entry by 5 mM Ca<sup>2+</sup> (Ca<sup>2+</sup> entry, WT 0.131 ± 0.014; *Homer2*<sup>-/-</sup> 0.089 ± 0.017) were no significant in pancreatic acinar cells between WT and *Homer2*<sup>-/-</sup> mice. (B) 2-aminoethoxydiphenyl borate (2APB, 50 μM) as an inositol 1,4,5-triphosphate receptor antagonist and store-operated Ca<sup>2+</sup> entry (SOCE) inhibitor, was not showed inhibitory effects for the Ca<sup>2+</sup> entry between WT and *Homer2*<sup>-/-</sup> mice (WT 0.061 ± 0.002; *Homer2*<sup>-/-</sup> 0.062 ± 0.002). (C) Gadolinium (Gd<sup>3+</sup>) is commonly used to analyze TRPC3-, TRPC6- or TRPC7-mediated receptor-operated Ca<sup>2+</sup> entry. Gd<sup>3+</sup> (5 μM) was significantly remained the Ca<sup>2+</sup> entry without the reduction of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in *Homer2*<sup>-/-</sup> pancreatic acinar cells as a compared to WT cells (WT 0.014 ± 0.008; *Homer2*<sup>-/-</sup> 0.071 ± 0.014). (D) SKF96365 is a potent TRPC channel blocker and a SOCE inhibitor. SKF96365 (30 μM) was completely inhibited the Ca<sup>2+</sup> entry in pancreatic acinar cells from WT and *Homer2*<sup>-/-</sup> mice (WT 0.012 ± 0.008; *Homer2*<sup>-/-</sup> 0.014 ± 0.007). (E) The magnitude of Ca<sup>2+</sup> entry by the stimulation of 100 μM CCh and 5 mM Ca<sup>2+</sup> was no difference between WT and *Homer2*<sup>-/-</sup> mice. (F) The bar graph was also presented the magnitude of Ca<sup>2+</sup> entry by the stimulation of various blocker between WT and *Homer2*<sup>-/-</sup> mice. Data are presented as mean ± standard error. \*p < 0.05 and \*\*p < 0.01 compared to the Ca<sup>2+</sup> entry by the stimulation of 5 mM Ca<sup>2+</sup> in WT cells.

하였다(Fig. 2C and 2F). 또한, TRPC 채널들과 저장고-의존성 칼슘 유입 반응의 특이적 억제제인 SKF96365를 처리한 후  $[Ca^{2+}]_i$ 를 측정하고, 대조군과 *Homer2*<sup>-/-</sup> 마우스의 췌장 선세포에서의  $[Ca^{2+}]_i$  유입은 현저히 감소되었으며 두 그룹 간의 유의성은 확인할 수 없었다(Fig. 2D and 2F). 이는 수용체-의존성 또는 저장고-의존성 칼슘 채널을 통한  $[Ca^{2+}]_i$  조절 작용에 Homer2 단백질이 관여함을 시사한다.

## Discussion

본 연구는 췌장 선세포에서 Homer2 단백질의 발현 억제를 통해 저장고- 및 수용체-의존성 칼슘 유입에 관여하는 채널들의 발현 증가 및 칼슘 신호전달 과정에서 Orai1의 발현 증가를 통해 TRPC3와 TRPC6를 통한 수용체-의존성 칼슘 유입이 강화되었음을 확인하였다. 이러한 결과는 Homer2 단백질의 발현이 칼슘 유입을 매개하는 채널들의 발현 및 작용에 영향을 미칠 수 있음을 시사한다.

이전의 연구에서 췌장 선세포에서의 Homer2 단백질의 발현 조절은 IP<sub>3</sub> 수용체의 발현 및 작용과는 상관없이 SERCA2 단백질(sarco/endoplasmic Ca<sup>2+</sup>-ATPase 2) 발현 조절을 통해  $[Ca^{2+}]_i$ 를 조절하며, GPCR 작용제 처리에 의해 RGS 단백질(regulators of G protein signaling protein)과 PLC의 GAP 단백질(GTPase-activating proteins)의 활성 조절을 통해 자극 민감도를 증가시킨다고 알려졌다[10]. 또한, 본 연구진의 이전 연구들에서 이하선 선세포에는 스캐폴드 단백질들이 결합할 수 있는 PDZ 도메인(PSD-95/Dlg/ZO-1 domain)이 PMCA C-말단에 위치하여 PDZ 도메인과 Homer1a의 결합으로 PMCA 발현 증가 및 세포 내 칼슘 제거에 대한 속도 향상을 보이는 반면, PMCA N-말단에 위치한 EVH1 도메인의 PPXXF 유사 모티프와 Homer2 결합은 이러한 반응들을 억제하며[12], 생리학적 농도의 carbachol 자극에 의해 발생된 칼슘 진동(oscillations)의 진폭(amplitude) 조절 및 타액 분비, 특히 아밀라아제 분비기능에 영향을 준다[11]는 것을 보고하였다. Homer2 단백질 발현 조절에 의한 세포 내 칼슘 유입에 관여하는 채널들의 발현 변화는 췌장 선세포에서만 유의하게 변하는 것을 확인할 수 있었다. 이것은 췌장과 같은 분비 조직에서 칼슘 유입 조절과 관련한 칼슘 신호전달 기전들이 주로 나타난다는 것을 재확인한 것이다[3]. 이전의 보고들에 따르면, 2APB는 thapsigargin 자극에 의해 Stim1 또는 Orai1-Stim1 복합체의 발현 증가로 활성화된 저장고-의존성 칼슘 유입 증가를 농도-의존적으로 억제하지만, Orai1과 Orai3의 활성화에 의한 칼슘 유입 증가 현상에 대해서는 억제 작용을 보이지 않는다고 알려져 있다[17]. 또한, DAG-민감 TRPC3, TRPC6, 또는 TRPC7 수용체들에 의해 매개된 수용체-의존성 칼슘 유입 증가 현상을 억제하는 것

으로 알려진 Gd<sup>3+</sup>은 Orai1과 Stim1의 과발현에 의한 수용체-의존성 칼슘 유입 증가에 대해서는 억제 작용을 보이지 않으며[18], TRPC3, TRPC6, 또는 TRPC7 매개 저장고-의존성 칼슘 유입의 증가 현상을 억제하는 것으로 알려진 SKF96365는 Orai1-Stim1 복합체의 단독 활성화에 의한 저장고-의존성 칼슘 유입 증가를 억제하지 못한다고 보고되었다[19]. 따라서, 본 연구 결과는 Homer2 단백질 발현 조절이 carbachol 자극에 의한 수용체-의존성 칼슘 유입 증가 반응 시 Orai1과 TRPC3, TRPC6의 발현 증가에 의해 저장고- 및 수용체-의존성 칼슘 유입에 대한 특이적 억제제들의 다양한 억제 반응을 유도하는 것임을 시사한다.

비흥분성 세포들에서 외부 자극에 대한 칼슘 신호의 변화들은 분비 작용과 밀접한 관련이 있으며, 이러한  $[Ca^{2+}]_i$ 의 증가는 Orai1과 Stim1에 의한 저장고-의존성 칼슘 유입과 형질막의 칼슘 채널들을 통한 수용체-의존성 칼슘 유입으로 구분되며, 특히 저장고-의존성 칼슘 유입 기전에 의한  $[Ca^{2+}]_i$ 의 증가는 세포 외 배출을 지속시키는 것으로 알려져 있다[3,20]. 이렇게 분비 세포들은  $[Ca^{2+}]_i$ 의 생성과 종축을 미세하게 조절하며 세포의 기능을 담당하지만, 세포의 손상이나 기능 이상, 질환 등에 의해 급성 췌장염, 구강건조증이나 자가면역 질환인 쇼그렌 증후군(Sjgren's syndrome) 등의 질환이 발생할 수 있다. 특히, 이러한 기능 이상은 Stim1과 TRPC 채널과 같은 칼슘 신호 인자들의 발현과 기능 변화에 기인하는 것으로 보고된다[3,20]. 본 연구의 결과는 Homer2 단백질과 Orai1, 그리고 TRPC3와 TRPC6 채널과 같은 저장고- 및 수용체-의존성 칼슘 유입 기전을 통하여 칼슘 신호의 활성화 및 분비 기능의 조절 가능성을 제시하였다. 본 논문은 비흥분성 분비 세포에서 Homer2 단백질이 직접적으로 세포 내 칼슘 신호전달 매개 채널들의 발현을 조절함과 동시에 다양한 칼슘 신호전달 패턴을 보여준다는 것을 직접적으로 보여주고 있으며, 이러한 연구결과는 분비 조직에서 발생하는 안구 또는 구강건조증, 급성 췌장염과 같은 질병 연구에 큰 도움이 될 것으로 생각한다.

## Acknowledgements

이 논문은 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(NRF-2015R1D1A1A01057277, NRF-2020R1A2C1004942).

## Conflicts of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

## References

- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000;1:11-21. doi: 10.1038/35036035.
- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:517-29. doi: 10.1038/nrm1155.
- Chvanov M, Voronina S, Criddle DN, Tepikin AV. The role of Ca<sup>2+</sup> signalling in the physiology and pathophysiology of exo-

- ocrine pancreas. *Curr Opin Physiol* 2020;17:96–105. doi: 10.1016/j.cophys.2020.07.013.
4. Mori MX, Itsuki K, Hase H, Sawamura S, Kurokawa T, Mori Y, Inoue R. Dynamics of receptor-operated Ca(2+) currents through TRPC channels controlled via the PI(4,5)P2–PLC signaling pathway. *Front Pharmacol* 2015;6:22. doi: 10.3389/fphar.2015.00022.
  5. Petersen OH, Tepikin AV. Polarized calcium signaling in exocrine gland cells. *Annu Rev Physiol* 2008;70:273–99. doi: 10.1146/annurev.physiol.70.113006.100618.
  6. Brakeman PR, Lanahan AA, O'Brien R, Roche K, Barnes CA, Huganir RL, Worley PF. Homer: a protein that selectively binds metabotropic glutamate receptors. *Nature* 1997;386:284–8. doi: 10.1038/386284a0.
  7. Worley PF, Zeng W, Huang G, Kim JY, Shin DM, Kim MS, Yuan JP, Kiselyov K, Muallem S. Homer proteins in Ca<sup>2+</sup> signaling by excitable and non-excitabile cells. *Cell Calcium* 2007;42:363–71. doi: 10.1016/j.ceca.2007.05.007.
  8. Smani T, Dionisio N, López JJ, Berna-Erro A, Rosado JA. Cytoskeletal and scaffolding proteins as structural and functional determinants of TRP channels. *Biochim Biophys Acta* 2014;1838:658–64. doi: 10.1016/j.bbamem.2013.01.009.
  9. Yuan JP, Kiselyov K, Shin DM, Chen J, Shcheynikov N, Kang SH, Dehoff MH, Schwarz MK, Seeburg PH, Muallem S, Worley PF. Homer binds TRPC family channels and is required for gating of TRPC1 by IP<sub>3</sub> receptors. *Cell* 2003;114:777–89. doi: 10.1016/s0092-8674(03)00716-5.
  10. Shin DM, Dehoff M, Luo X, Kang SH, Tu J, Nayak SK, Ross EM, Worley PF, Muallem S. Homer 2 tunes G protein-coupled receptors stimulus intensity by regulating RGS proteins and PLCβ GAP activities. *J Cell Biol* 2003;162:293–303. doi: 10.1083/jcb.200210109.
  11. Kang N, Kang JY, Shin DM, Yang YM. Homer2 regulates amylase secretion via physiological calcium oscillations in mouse parotid gland acinar cells. *Int J Oral Biol* 2020;45:58–63. doi: 10.11620/IJOB.2020.45.2.58.
  12. Yang YM, Lee J, Jo H, Park S, Chang I, Muallem S, Shin DM. Homer2 protein regulates plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase-mediated Ca<sup>2+</sup> signaling in mouse parotid gland acinar cells. *J Biol Chem* 2014;289:24971–9. doi: 10.1074/jbc.M114.577221.
  13. Stiber JA, Tabatabaei N, Hawkins AF, Hawke T, Worley PF, Williams RS, Rosenberg P. Homer modulates NFAT-dependent signaling during muscle differentiation. *Dev Biol* 2005;287:213–24. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.06.030.
  14. Huang GN, Huso DL, Bouyain S, Tu J, McCorkell KA, May MJ, Zhu Y, Lutz M, Collins S, Dehoff M, Kang S, Whartenby K, Powell J, Leahy D, Worley PF. NFAT binding and regulation of T cell activation by the cytoplasmic scaffolding Homer proteins. *Science* 2008;319:476–81. doi: 10.1126/science.1151227.
  15. Son A, Kang N, Oh SY, Kim KW, Muallem S, Yang YM, Shin DM. Homer2 and Homer3 modulate RANKL-induced NFATc1 signaling in osteoclastogenesis and bone metabolism. *J Endocrinol* 2019;242:241–9. doi: 10.1530/JOE-19-0123.
  16. Kang JY, Kang N, Shin DM, Yang YM. Deficiencies of Homer2 and Homer3 accelerate aging-dependent bone loss in mice. *Int J Oral Biol* 2020;45:126–33. doi: 10.11620/IJOB.2020.45.3.126.
  17. DeHaven WI, Smyth JT, Boyles RR, Bird GS, Putney JW Jr. Complex actions of 2-aminoethylidiphenyl borate on store-operated calcium entry. *J Biol Chem* 2008;283:19265–73. doi: 10.1074/jbc.M801535200.
  18. Liao Y, Erxleben C, Abramowitz J, Flockerzi V, Zhu MX, Armstrong DL, Birnbaumer L. Functional interactions among Orai1, TRPCs, and STIM1 suggest a STIM-regulated heteromeric Orai/TRPC model for SOCE/Icrac channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:2895–900. doi: 10.1073/pnas.0712288105.
  19. He X, Li S, Liu B, Susperreguy S, Formoso K, Yao J, Kang J, Shi A, Birnbaumer L, Liao Y. Major contribution of the 3/6/7 class of TRPC channels to myocardial ischemia/reperfusion and cellular hypoxia/reoxygenation injuries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017;114:E4582–91. doi: 10.1073/pnas.1621384114.
  20. Ambudkar IS. Calcium signalling in salivary gland physiology and dysfunction. *J Physiol* 2016;594:2813–24. doi: 10.1113/JP271143.