

# Homer2 regulates amylase secretion via physiological calcium oscillations in mouse parotid gland acinar cells

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

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

<sup>2</sup>BK21 PLUS Project, Yonsei University College of Dentistry, Seoul 03722, Republic of Korea

The salivary glands secrete saliva, which plays a role in the maintenance of a healthy oral environment. Under physiological conditions, saliva secretion within the acinar cells of the gland is regulated by stimulation of specific calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) signaling mechanisms such as increases in the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) via store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry, which involves components such as Orai1, transient receptor potential (TRP) canonical 1, stromal interaction molecules, and inositol 1,4,5-triphosphate ( $\text{IP}_3$ ) receptors ( $\text{IP}_3\text{Rs}$ ). Homer proteins are scaffold proteins that bind to G protein-coupled receptors,  $\text{IP}_3\text{Rs}$ , ryanodine receptors, and TRP channels. However, their exact role in  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in the salivary glands remains unknown. In the present study, we investigated the role of Homer2 in  $\text{Ca}^{2+}$  signaling and saliva secretion in parotid gland acinar cells under physiological conditions. Deletion of *Homer2* (*Homer2*<sup>-/-</sup>) markedly decreased the amplitude of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  oscillations via the stimulation of carbachol, which is physiologically concentrated in parotid acinar cells, whereas the frequency of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  oscillations showed no difference between wild-type and *Homer2*<sup>-/-</sup> mice. *Homer2*<sup>-/-</sup> mice also showed a significant decrease in amylase release by carbachol in the parotid gland in a dose-dependent manner. These results suggest that Homer2 plays a critical role in maintaining  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  concentration and secretion of saliva in mouse parotid gland acinar cells.

**Keywords:** Calcium signaling, Salivation, Acinar cells, Physiological phenomena

## Introduction

세포 내 칼슘 이온은 이차 메신저로서 수정, 근육 수축, 신경전달물질 분비, 체액 분비, 세포외배출, 학습과 기억 같은 활동에 중요한 역할을 담당한다[1,2]. 이 중 타액선에서의 타액 분비는 세포 내 칼슘 농도 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ )를 조절하는 수용체들에 의해 조절된다고 알려져 있다. 주로, 타액선의 포상세포(acinar cell)와 도관세포(ductal cell)에 존재하는 M1과 M3 콜린성 수용체들의 활성화에 의해 분비된 아세틸콜린이  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 를 증가시켜 체액 분비를 자극한다. 아드레날린성 수용체의 활성화에 의해 분비된 cyclic adenosine monophosphate는 포상세포에서는 효소의

분비를 자극하고 도관세포에서는 탄산수소 이온( $\text{HCO}_3^-$ ) 분비를 포함하는 체액과 전해질 운반을 조절한다. 또한, 포상세포와 도관세포에 존재하는 퓨린성 수용체들도  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 의 증가에 의해 활성화되어 타액선의 분비를 자극한다[3,4].

타액선에서의 칼슘 신호조절은 아세틸콜린과 같은 작용제가 G-단백 결합 수용체(G protein coupled receptor, GPCR)의 G 단백질에 결합하여 phospholipase C (PLC) 활성화 후 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate를 가수분해시켜 inositol 1,4,5-triphosphate ( $\text{IP}_3$ )를 생성한다. 이렇게 생성된  $\text{IP}_3$ 는 세포질그물(endoplasmic reticulum)에 있는  $\text{IP}_3$  수용체를 활성화하여 세포질그물에 저장된 칼

Received April 27, 2020; Revised May 13, 2020; Accepted May 13, 2020

\*Correspondence to: Dong Min Shin, E-mail: dmshin@yuhs.ac <https://orcid.org/0000-0001-6042-0435>

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

†Namju Kang and Jung Yun 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.

숨 분비를 통해  $[Ca^{2+}]_i$ 를 증가시킨다. 이러한, 세포질그물의 칼슘 고갈에 의해 활성화되는 저장고-의존성 칼슘 유입(store-operated  $Ca^{2+}$  entry)은 세포질그물 칼슘 센서인 stromal interaction molecule 1 (STIM1)과 형질막(plasma membrane)의 Orai와 transient receptor potential canonical (TRPC) 채널들이 클러스터를 형성하여 활성화되며, 증가된  $[Ca^{2+}]_i$ 은 칼슘 배출기전을 활성화시켜 sarco/endoplasmic  $Ca^{2+}$ -ATPase (SERCA)와 plasma membrane  $Ca^{2+}$ -ATPase (PMCA)를 통해 세포질 밖으로 칼슘을 이동시켜 기저 수준의  $[Ca^{2+}]_i$ 로 회복된다[2-5].

이러한, GPCR 중 일부는 스캐폴드 단백질인 Homer 그룹의 단백질들과 결합할 수 있는 결합 모티프를 가지고 있다. Homer 그룹은 여러 개의 스플라이싱 변이들을 통해 Homer1, Homer2, Homer3로 분류된다. 이 중, 짧은 형태의 Homer1a는 신경 세포에서 지속적 자극에 의해 직접적으로 발현되는 초기 유전자 생산물로 발견되었다[6]. Homer1a를 제외한 모든 Homer 단백질들은 긴 형태를 지니고 있으며 추중신경계 전반에 고르게 발현되어 있다. Homer 단백질들은 N-말단에 Ena/VASP homology 1 (EVH1) 단백질 결합 도메인과 C-말단에 coiled-coil 복합(multimerization) 도메인과 류신 지퍼(leucine zipper)를 가지고 있으며, 특히, EVH1 도메인은 일부 GPCR들, TRPC 채널들,  $IP_3$  수용체들, ryanodine 수용체들(RyRs), 그리고 스캐폴드 단백질인 Shank 그룹 등과 결합할 수 있는 곳이다[7]. Homer 단백질은 신경 세포의 시냅스 활성을 조절하는 시냅스 단백질로 알려졌으나[6,7], 이후 비활성 세포에서의 연구들을 통해 Homer1은 TRPC 채널과  $IP_3$  수용체들의 결합을 도와 칼슘의 유입을 조절하고[8], Homer2는 췌장의 포상세포에서 G 단백질과 PLC 활성 조절을 통해 GPCR들의 칼슘 신호 유발 자극 강도를 조절하며[9], 이하선 포상세포에서는 PMCA와의 결합을 통해  $[Ca^{2+}]_i$ 를 조절한다[10]는 것이 밝혀졌다. 또한, 골격근에서 Homer2는 근세포 분화 과정 동안 RyR을 통한 칼슘 분비를 증가시켜 nuclear factor of activated T cells type c1 (NFATc1)-의존적 신호전달경로를 활성화시키고[11], Homer2와 Homer3가 T 림프구와 파골세포에서 calcineurin과 경쟁적으로 NFAT에 결합하여 T 세포의 활성화[12] 및 파골세포 분화 조절[13]에 관여한다.

GPCR 작용제의 생리학적 농도 자극에 의해 발생하는 칼슘 신호는 주기적으로 반복되는 칼슘 진동(oscillations)의 형태로 나타나며, 굴모양(sinusoidal) 칼슘 진동과 기저선을 따라 극파(spike)가 발생하는 일과성(transient) 칼슘 진동으로 구분된다. 또한, 칼슘 진동의 주파수(frequency)와 진폭(amplitude)은 수용체 자극 강도에 의해 결정된다[14-16]. 칼슘 진동은 항상 세포의 첨단부 극(apical pole) 쪽에서 시작하여 기저부 극(basal pole) 쪽으로 칼슘 파동(waves)의 형태로 진행되며[17-19], 칼슘 신호전달의 기본적 측면은 유사하지만 작용제 자극에 대한 민감도, 칼슘 진동의 주파수, 칼슘 파동의 속도 등 세부적 측면에서 췌장 세포와 타액선 세포에서의 칼슘 신호전달은 명확하게 구분된다[5,14,20,21]. 이러한 칼슘의 파동은 첨단부 쪽에 위치한 칼슘 신호 구조물들과 밀접한 관련이 있는 것으로 여겨지며[22], 췌장 포상세포의 경우 칼슘 진동의 발생이 첨단부 극 쪽으로 국한될 수 있고, 칼슘 진동은 시공간적 측면에서 세포의 종류에 따라 다르게 나타난다고 알려

져 있다[23]. 그럼에도 불구하고, 비활성 세포의 칼슘 신호 유발과정에서 Homer 단백질들의 역할은 여전히 명확히 알려져 있지 않아 본 연구에서는 Homer2 유전자 제거(*Homer2*<sup>-/-</sup>) 마우스를 이용하여 이하선 포상세포에서 칼슘 신호 유발에 따른 칼슘 및 아밀라아제 분비에 대한 Homer2의 역할을 알아보고자 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)와 D-glucose는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

### 2. 실험동물

대조군과 *Homer2* 유전자 제거(*Homer2*<sup>-/-</sup>) 마우스는 선행 연구에서 제작/사용되었던 실험동물(25-28 g)을 사용하였다[9,10]. 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. 이하선의 포상세포 분리

이하선의 포상세포 분리는 콜라게네이즈 분해법(collagenase digestion)을 이용하여 선행연구에서 사용된 방법과 동일하게 실시하였다[10]. 분리된 세포는 생리식염수(140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM  $MgCl_2$ , 1 mM  $CaCl_2$ , 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. 세포 내 칼슘 농도( $[Ca^{2+}]_i$ ) 측정

$[Ca^{2+}]_i$ 의 변화를 측정하기 위하여 대조군과 *Homer2*<sup>-/-</sup> 마우스에서 분리한 이하선 포상세포는 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 이미징들은 도립 현미경(inverted mi-

croscope, Nikon Instruments Inc., Tokyo, Japan)에 부착된 CCD 카메라(Teledyne Photometrics, Tucson, AZ, USA)를 통하여 컴퓨터에서 1초 간격으로 기록하였다. 모든 실험자료의 분석은 MetaFluor software (Molecular Devices)를 이용하였다.

### 5. 아밀라아제 분비량 측정

실험동물은 실험 전 24시간 동안 물을 제외하고 금식시켰다. 각각의 포상세포는 세포 내 칼슘 측정 시 사용된 carbachol의 농도로 자극하였다. 포상세포들은 60 rpm의 속도로 37°C 진탕 배양기 안에서 20분간 carbachol을 처리한 후 초음파기로 용해시켜 13,000 rpm의 속도로 10분간 원심분리 후 정제되었다. 총 아밀라아제 함량 또는 배양액으로 방출된 아밀라아제 함량은 이전 실험방법 등을 참조하여 측정하였다[24-26]. 배양액과 homogenized 이하선 상층액을 소량 분리하여 37°C에서 10분 동안 0.5% 전분(starch)을 처리한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 배양액 내 아밀라아제 활성도는 총활성도에 대한 백분율로 표시하였다.

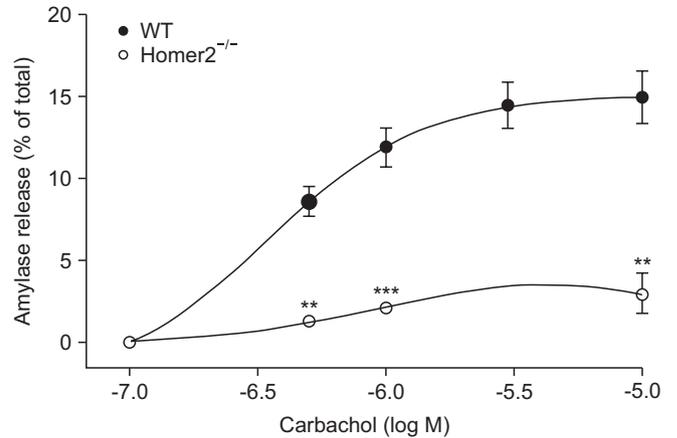
### 6. 실험자료의 통계 분석

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

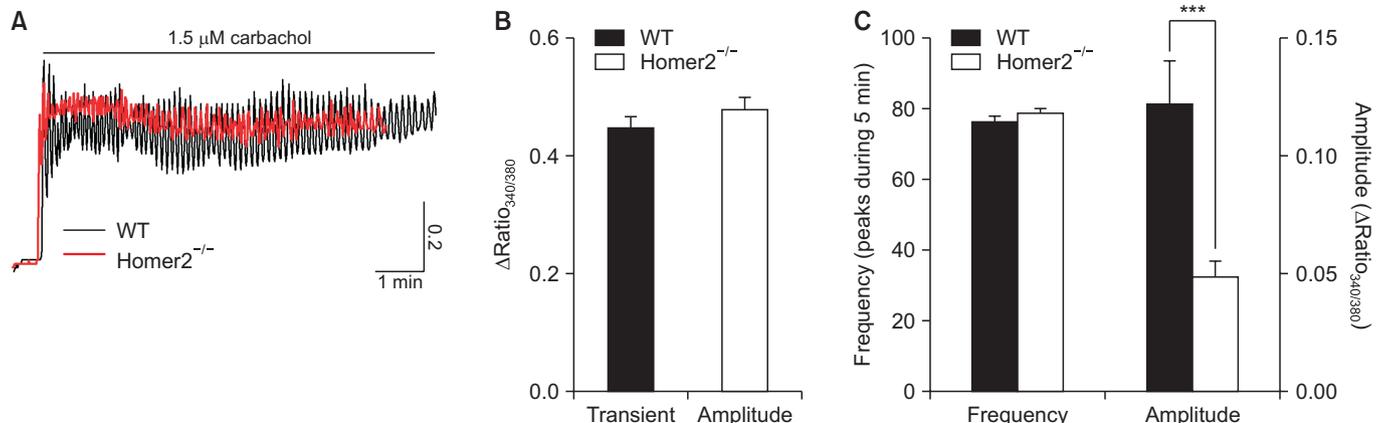
## Results

### 1. 작용제에 의한 세포 내 칼슘의 변화 양상

이전의 연구들에서 *Homer2*<sup>-/-</sup> 마우스의 취장과 이하선 포상세포에서 *Homer2* 단백질 발현의 감소는 칼슘 신호 관련 단백질의 발현 변화 및 GPCR 작용제에 대한 칼슘 신호의 변화를 유발하였다[9,10]. 대조군과 *Homer2*<sup>-/-</sup> 마우스의 이하선에서 분리된 포상세포에 생리학적인



**Fig. 2.** Measurements of  $Ca^{2+}$ -dependent amylase secretion in parotid gland acinar cells of wild-type (WT) and *Homer2*<sup>-/-</sup> mice. Amylase release in parotid gland cells of *Homer2*<sup>-/-</sup> mice reduced an increase of secretions for carbachol stimulation in a dose-dependent manner compared to WT mice. Data were expressed as a percentage of the total amylase activity and are presented as the mean ± S.E. \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .



**Fig. 1.** Agonist-evoked intracellular  $Ca^{2+}$  concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) changes in parotid gland acinar cells from wild-type (WT) and *Homer2*<sup>-/-</sup> mice. (A) Application of 1.5  $\mu$ M carbachol produced a  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations and the changes of  $[Ca^{2+}]_i$  fluorescent (Ratio =  $F_{340}/F_{380}$ ) were traced as a function of WT and *Homer2*<sup>-/-</sup> cells. (B) Transient amplitude bar graph for carbachol-induced changes of  $[Ca^{2+}]_i$  fluorescent. The transient amplitude by carbachol had no difference between *Homer2*<sup>-/-</sup> and WT cells. (C) Frequency and amplitude bar graph for carbachol-induced changes of fluorescent by  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations. The amplitude of  $[Ca^{2+}]_i$  oscillation by carbachol stimulation reduced in *Homer2*<sup>-/-</sup> cells compared to WT cells. Data are depicted as the mean ± S.E. \*\*\* $p < 0.001$ .

극 농도인 1.5  $\mu$ M carbachol 자극에 의해  $[Ca^{2+}]_i$ 의 증가 후 기저 수준의  $[Ca^{2+}]_i$ 로 돌아오지 않고 증가된 상태를 유지하는 굴모양 칼슘 진동이 나타나는 것을 확인하였다(Fig. 1A). 자극 이후 초기  $[Ca^{2+}]_i$ 의 변화는 일과성 진폭(transient amplitude)으로 나타났으며, 대조군과 *Homer2*<sup>-/-</sup> 마우스 모두에서 비슷하게 관찰되었다(Fig. 1B). 이러한 굴모양 칼슘 진동은 일정한 주파수를 가지고 유발되는 반면, 진동의 진폭은 *Homer2*<sup>-/-</sup> 마우스의 포상세포에서 현저히 감소되어 나타나는 것을 확인하였다(Fig. 1C). 이러한 결과들은 Homer2 단백질이  $[Ca^{2+}]_i$ 의 조절과 상관 관계가 있음을 시사한다.

## 2. 칼슘 의존적 아밀라아제의 분비기능 변화

Homer2 단백질 발현 억제에 따른 이하선 포상세포에서의 아밀라아제 분비에 대한 영향을 조사하였다. 각 마우스의 이하선 포상세포에  $1 \times 10^{-7}$ ,  $5 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $3 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5}$  M의 carbachol을 처리한 후 아밀라아제의 분비를 측정하는 결과, 대조군 마우스의 이하선 세포에서 농도 의존적으로 아밀라아제 분비가 증가되는 것을 확인하였다. 반면, *Homer2*<sup>-/-</sup> 마우스의 이하선 세포에서의 아밀라아제 분비는 대조군에 비해 현저히 감소되는 것을 확인하였다(Fig. 2). 이는  $[Ca^{2+}]_i$  조절에 대한 Homer2 단백질의 작용이 아밀라아제 분비기능 조절에도 관여함을 시사한다.

## Discussion

본 연구는 타액 분비를 담당하는 이하선 포상세포에서 Homer2 단백질이 칼슘 신호전달과 타액 분비기능 조절에 미치는 영향을 생리학적 농도의 작용제를 사용하여 조사하였다. Homer2 단백질은 이하선 포상세포에서 생리학적 자극 농도의 carbachol에 의해 발생된 칼슘 진동의 진폭을 조절하며, 칼슘 신호에 영향을 받는 타액 분비, 특히 아밀라아제 분비기능에 영향을 미치는 것을 확인하였다.

이전의 연구들에서 Homer2 단백질의 발현 조절은 IP<sub>3</sub> 수용체의 발현과 기능에는 영향을 미치지 않지만, 췌장의 포상세포에서 SERCA2 발현을 조절하여  $[Ca^{2+}]_i$ 를 조절하고, 생리학적 자극 농도의 GPCR 작용제 처리 시 regulators of G-protein signaling proteins (RGS)와 PLC $\beta$ 의 GTPase-activating proteins의 활성 조절을 통해 자극에 대한 민감도를 증가시킨다는 보고가 있었다[9]. 또한, 이하선의 포상세포에는 PMCA의 C-말단에 다양한 스캐폴드 단백질이 결합할 수 있는 PDZ 도메인(PSD-95/Dlg/ZO-1 domain)이 위치하며, PDZ 도메인과 Homer1a의 결합을 통해 PMCA의 발현 증가 및 세포 내 칼슘 제거 속도를 향상시키는 반면, PMCA의 N-말단에 위치한 EVH1 도메인의 PPXXF 유사 모티프와 Homer2가 결합하여 이러한 반응들을 억제한다고 보고되었다[10]. 그러나, Homer2 단백질의 발현과 칼슘 신호 전달에 따른 타액 분비와의 상관 관계를 직접적으로 보여준 연구 결과는 없었다.

많은 세포 유형에서  $[Ca^{2+}]_i$ 의 변화는 자극의 강도에 따라 또는 표적 단백질의 세포 내 위치와 관련하여 칼슘 진동이 주파수나 진폭의 형태로 다양하게 인코딩되어 나타날 수 있다[2,27-30]. 특히, NFAT, nuclear

factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)와 같은 다양한 전사 인자들, calmodulin kinase II와 같은 칼슘-의존성 효소들, 그리고 미토콘드리아의 칼슘 진동의 민감도 등은 칼슘 진동의 주파수로 인코딩되어 나타난다[30]. 또한, 칼슘 파동의 진폭과 NF- $\kappa$ B/signal transducer and activator of transcription 3 전사 인자의 활성을 위해 필요한  $[Ca^{2+}]_i$ 의 증가 시점까지의 칼슘 파동 지속 시간(duration)이 작용제 자극에 의한 전사와 유전자 발현을 조절하며[27,31],  $[Ca^{2+}]_i$ 과 IP<sub>3</sub> 수용체의 활성 정도에 따라 칼슘 진동의 진폭이 변화되어 나타날 수 있다[14,20,22,32]. Yang 등[10]의 보고에 의하면 이하선의 포상세포에서 Homer2 단백질 발현 억제는 GPCR 작용제에 대한 IP<sub>3</sub> 생성, IP<sub>3</sub> 수용체의 발현과 작용에 대해 어떠한 영향도 미치지 않았고, 고농도의 작용제 자극에 의한  $[Ca^{2+}]_i$ 의 증가는 대조군과 비슷하였으나, 칼슘 제거 속도는 급격히 향상되었다. 이러한 결과들은 Homer2 단백질이 이하선 포상세포에서 고농도의 작용제 자극에 대한  $[Ca^{2+}]_i$ 의 증가 또는 총 칼슘 증가량에 대한 영향보다 저농도의 작용제 자극에 대한 칼슘 신호 조절에 직접적으로 관여하며, 칼슘 신호-의존적 타액 분비에 영향을 줄 가능성이 있음을 시사한다. 반면, 췌장의 포상세포에서 GPCR 작용제의 저농도 자극에 의해 생성된 칼슘 파동은 *Homer2* 발현 억제에 의해 GPCR의 민감도가 증가하여 칼슘 파동의 주파수가 급격히 증가되었으며[9], *RGS4* 발현 억제에 의해서도 칼슘 파동의 주파수가 급격히 증가되어 아밀라아제 분비를 증가시켰다[26]. 이러한 결과는 본 연구 결과와는 차이를 보이는데, Yang 등[10]의 보고를 근거해서 조직 특이적 반응의 결과로 여겨진다.

비흥분성 세포들에서 외부 자극에 대한 칼슘 신호의 크기와 시공간적 변화들은 분비 작용과 밀접한 관련이 있으며, 이러한  $[Ca^{2+}]_i$ 의 증가는 IP<sub>3</sub>에 의한 세포질골 내 칼슘 저장고에서의 칼슘 분비와 형질막의 칼슘 채널들을 통한 칼슘 유입으로 구분된다. 특히, 세포질골의 IP<sub>3</sub> 수용체에 의해  $[Ca^{2+}]_i$  신호의 개시와 패턴이 정해지며, 세포 내 칼슘의 유입은 저장고-의존성 칼슘 유입 기전에 의해  $[Ca^{2+}]_i$ 의 증가와 타액 분비를 지속시키는 일을 담당한다[4,14,16,33]. 이렇게 분비 세포들은  $[Ca^{2+}]_i$  신호의 생성과 증폭을 미세하게 조절하며 세포의 기능을 담당하지만, 세포의 손상이나 기능 이상, 질환 등에 의해 구강건조증이나 자가면역 질환인 쇼그렌 증후군(Sjögren's syndrome) 등의 질환이 발생하게 된다. 특히, 이러한 기능 이상은 STIM1과 TRP 채널과 같은 칼슘 신호 인자들의 발현과 기능 변화에 기인한다[33]. 이전 보고들과 함께 본 연구의 결과들을 통하여 Homer2 단백질은 STIM1, TRP 채널과 같은 저장고-의존성 칼슘 유입 기전에 의해 칼슘 신호의 활성을 조절하여 칼슘 신호전달계를 통해 타액 분비기능을 조절할 것으로 여겨진다[7,8]. 본 논문은 Homer2 단백질이 직접적으로 세포 내 칼슘 신호전달 기전에 작용함과 동시에 타액 분비기능 활성에도 관여한다는 내용을 명확히 보여주고 있으며, 구강건조증과 같은 질병 연구에 큰 도움이 될 것으로 생각한다.

## Acknowledgements

이 논문은 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(NRF-2020R1A2C2003409).

## 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.
- Lee MG, Ohana E, Park HW, Yang D, Muallem S. Molecular mechanism of pancreatic and salivary gland fluid and HCO<sub>3</sub> secretion. *Physiol Rev* 2012;92:39–74. doi: 10.1152/physrev.00011.2011.
- Ambudkar IS. Ca<sup>2+</sup> signaling and regulation of fluid secretion in salivary gland acinar cells. *Cell Calcium* 2014;55:297–305. doi: 10.1016/j.ceca.2014.02.009.
- 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.
- 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.
- 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-excitable cells. *Cell Calcium* 2007;42:363–71. doi: 10.1016/j.ceca.2007.05.007.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Berridge MJ. Calcium oscillations. *J Biol Chem* 1990;265:9583–6.
- Sneyd J, Han JM, Wang L, Chen J, Yang X, Tanimura A, Sanderson MJ, Kirk V, Yule DI. On the dynamical structure of calcium oscillations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017;114:1456–61. doi: 10.1073/pnas.1614613114.
- Samanta K, Parekh AB. Spatial Ca<sup>2+</sup> profiling: decrypting the universal cytosolic Ca<sup>2+</sup> oscillation. *J Physiol* 2017;595:3053–62. doi: 10.1113/JP272860.
- Li Q, Luo X, Muallem S. Functional mapping of Ca<sup>2+</sup> signaling complexes in plasma membrane microdomains of polarized cells. *J Biol Chem* 2004;279:27837–40. doi: 10.1074/jbc.C400184200.
- Kasai H, Augustine GJ. Cytosolic Ca<sup>2+</sup> gradients triggering unidirectional fluid secretion from exocrine pancreas. *Nature* 1990;348:735–8. doi: 10.1038/348735a0.
- Kasai H, Li YX, Miyashita Y. Subcellular distribution of Ca<sup>2+</sup> release channels underlying Ca<sup>2+</sup> waves and oscillations in exocrine pancreas. *Cell* 1993;74:669–77. doi: 10.1016/0092-8674(93)90514-q.
- Gray PT. Oscillations of free cytosolic calcium evoked by cholinergic and catecholaminergic agonists in rat parotid acinar cells. *J Physiol* 1988;406:35–53. doi: 10.1113/jphysiol.1988.sp017367.
- Thorn P, Lawrie AM, Smith PM, Gallacher DV, Petersen OH. Local and global cytosolic Ca<sup>2+</sup> oscillations in exocrine cells evoked by agonists and inositol trisphosphate. *Cell*

- 1993;74:661–8. doi: 10.1016/0092–8674(93)90513–p.
22. Larina O, Thorn P.  $Ca^{2+}$  dynamics in salivary acinar cells: distinct morphology of the acinar lumen underlies near-synchronous global  $Ca^{2+}$  responses. *J Cell Sci* 2005;118(Pt 18):4131–9. doi: 10.1242/jcs.02533.
  23. Giovannucci DR, Bruce JI, Straub SV, Arreola J, Sneyd J, Shuttleworth TJ, Yule DI. Cytosolic  $Ca^{2+}$  and  $Ca^{2+}$ -activated  $Cl^{-}$  current dynamics: insights from two functionally distinct mouse exocrine cells. *J Physiol* 2002;540(Pt 2):469–84. doi: 10.1113/jphysiol.2001.013453.
  24. Bernfeld P. Enzymes of starch degradation and synthesis. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem* 1951;12:379–428. doi: 10.1002/9780470122570.ch7.
  25. Choi JH, Jo H, Hong JH, Lee SI, Shin DM. Alteration of expression of  $Ca^{2+}$  signaling proteins and adaptation of  $Ca^{2+}$  signaling in SERCA2+/- mouse parotid acini. *Yonsei Med J* 2008;49:311–21. doi: 10.3349/ymj.2008.49.2.311.
  26. Park S, Lee SI, Shin DM. Role of regulators of G-protein signaling 4 in  $Ca^{2+}$  signaling in mouse pancreatic acinar cells. *Korean J Physiol Pharmacol* 2011;15:383–8. doi: 10.4196/kjpp.2011.15.6.383.
  27. Dolmetsch RE, Lewis RS, Goodnow CC, Healy JI. Differential activation of transcription factors induced by  $Ca^{2+}$  response amplitude and duration. *Nature* 1997;386:855–8. doi: 10.1038/386855a0.
  28. Gaspers LD, Thomas AP. Calcium signaling in liver. *Cell Calcium* 2005;38:329–42. doi: 10.1016/j.ceca.2005.06.009.
  29. Rizzuto R, Pozzan T. Microdomains of intracellular  $Ca^{2+}$ : molecular determinants and functional consequences. *Physiol Rev* 2006;86:369–408. doi: 10.1152/physrev.00004.2005.
  30. Smedler E, Uhlén P. Frequency decoding of calcium oscillations. *Biochim Biophys Acta* 2014;1840:964–9. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.11.015.
  31. Song S, Li J, Zhu L, Cai L, Xu Q, Ling C, Su Y, Hu Q. Irregular  $Ca^{2+}$  oscillations regulate transcription via cumulative spike duration and spike amplitude. *J Biol Chem* 2012;287:40246–55. doi: 10.1074/jbc.M112.417154.
  32. Gaspers LD, Bartlett PJ, Politi A, Burnett P, Metzger W, Johnston J, Joseph SK, Höfer T, Thomas AP. Hormone-induced calcium oscillations depend on cross-coupling with inositol 1,4,5-trisphosphate oscillations. *Cell Rep* 2014;9:1209–18. doi: 10.1016/j.celrep.2014.10.033.
  33. Ambudkar IS. Calcium signalling in salivary gland physiology and dysfunction. *J Physiol* 2016;594:2813–24. doi: 10.1113/JP271143.