

Regulatory mechanisms of the store-operated Ca^{2+} entry through Orai1 and STIM1 by an adaptor protein in non-excitabile cells

Jung Yun Kang¹ and Yu-Mi Yang^{2*}

¹Department of Dental Hygiene, College of Software Digital Healthcare Convergence, Yonsei University, Wonju 26493, Republic of Korea

²Department of Oral Biology, Yonsei University College of Dentistry, Seoul 03722, Republic of Korea

Store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) represents one of the major Ca^{2+} entry routes in non-excitabile cells. It is involved in a variety of fundamental biological processes and the maintenance of Ca^{2+} homeostasis. The Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} (CRAC) channel consists of stromal interaction molecule and Orai; however, the role and action of Homer proteins as an adaptor protein to SOCE-mediated Ca^{2+} signaling through the activation of CRAC channels in non-excitabile cells still remain unknown. In the present study, we investigated the role of Homer2 in the process of Ca^{2+} signaling induced by the interaction between CRACs and Homer2 proteins in non-excitabile cells. The response to Ca^{2+} entry by thapsigargin-mediated Ca^{2+} store depletion remarkably decreased in pancreatic acinar cells of Homer2^{-/-} mice, as compared to wild-type cells. It also showed critical differences in regulated patterns by the specific blockers of SOCE in pancreatic acinar cells of Homer2^{-/-} mice. The response to Ca^{2+} entry by the depletion in Ca^{2+} store markedly increased in the cellular overexpression of Orai1 and STIM1 as compared to the overexpression of Homer2 in cells; however, this response was remarkably inhibited by the overexpression of Orai1, STIM1, and Homer2. These results suggest that Homer2 has a critical role in the regulatory action of SOCE activity and the interactions between CRAC channels.

Keywords: Calcium signaling, Ion channel gating, Orai1 protein, Stromal interaction molecule 1

Introduction

세포 내 칼슘 이온은 이차 전령체로서 유전자 발현, 세포의 성장, 분화 및 사멸과 같은 기초 생물학적 활동에 중요한 역할을 담당한다. 세포 내 칼슘 농도($[\text{Ca}^{2+}]$)의 증가는 크게 세포질 그물망(endoplasmic reticulum, ER) 또는 근육세포질 그물망(sarcoplasmic reticulum) 내에 저장된 칼슘의 방출과 형질막(plasma membrane)을 통한 세포외 칼슘 유입의 두 가지로 나뉜다. Store-operated Ca^{2+} entry (SOCE)는 세포내 칼슘 저장고인 ER의 칼슘 고갈에 의한 신호 유발과 형질막에 있는 칼슘 채널의 열림에 의해 세포 내부로 칼슘이 유입되는 두 과정이 결합

되어 세포 내 칼슘 신호를 생성하는 기전으로 세포의 칼슘 신호 전달 및 세포 내 칼슘 조절과 저장 등의 항상성 유지 기능을 세포 전반에서 수행한다[1,2]. SOCE를 매개하는 Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} (CRAC) 채널은 Orai 채널과 transient receptor potential canonical (TRPC) 채널 및 이 두 채널의 개폐에 관여하는 ER 칼슘 센서인 stromal interaction molecule 1 (STIM1)으로 구성된다[3-7]. 세포내 칼슘 저장고가 고갈되면 STIM1의 STIM1 Orai1-activating region (SOAR) 영역이 Orai1에 결합하여 Orai1 채널의 열림을 촉진하고, STIM1의 SOAR 영역이 TRPC 채널에도 직접 결합하여 TRPC 채널들과 정전기적 상호작용(electrostatic interaction)에 의해 채널의 열림을 활성화시킨다

Received September 13, 2022; Revised September 17, 2022; Accepted September 19, 2022

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

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.

고 알려져 있다[7,8]. STIM1은 SOAR 영역을 통해 $Ca_v1.2$ 채널과 결합하여 $Ca_v1.2$ 채널의 열림을 강하게 억제시켜 Orai 채널의 활성을 유도하고[9], 칼슘 저장고 고갈에 의한 STIM1과 $Ca_v1.2$ 채널의 상호 작용을 어댑터 단백질(adaptor protein)인 Homer1이 도움을 준다고 보고된 바 있다[10]. 또한, inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3) 수용체 (IP_3Rs)도 TRPC 채널들과 결합하여 활성을 조절하는데[11], 이 과정에서 Homer1이 조절작용을 돕는다[12].

어댑터 단백질 중의 하나인 Homer 단백질은 Homer1, Homer2, Homer3로 분류된다. Homer 단백질들은 N-말단에 Ena/VASP homology 1 (EVH1) 단백질 결합 도메인이 존재하며, 이 도메인은 칼슘을 조절하는 phospholipase C (PLC), IP_3 수용체들, ryanodine 수용체들(RyRs) 및 Orai 채널, TRPC 채널들과 칼슘 채널들 같은 단백질들에 존재하는 PPXXFL나 LPSSP가 포함된 리간드와 결합할 수 있는 곳으로 알려져 있다[10,12-14]. 이러한 Homer 단백질은 신경 세포에서 시냅스 활성을 조절하는 시냅스 단백질로 처음 알려졌다[13,15], 이후 연구들을 통해 세 가지의 Homer 단백질이 칼슘 신호 전달기전에서 서로 다른 역할을 수행하는 것으로 보고되었다. Homer1은 TRPC 채널과 IP_3 수용체들의 결합 및 CRAC 채널인 Orai 채널과 STIM1의 결합을 도와 칼슘 유입을 조절한다[12,14,16]. Homer2는 췌장의 선세포에서 RGS (regulator of G-protein signaling) 단백질과 PLC의 GAP (GTPase-activating protein) 활성 조절을 통해 GPCR (G protein-coupled receptor)들의 칼슘 신호 유발 자극에 대한 강도를 조절하며, Homer2 단백질과 CRAC 채널들 간의 상호 작용을 통해 세포 내 칼슘 신호를 조절 가능하게 한다[17,18]. 또한, 이차신 선세포에서 Homer2는 plasma membrane Ca^{2+} -ATPase (PMCA)와 결합하여 $[Ca^{2+}]_i$ 를 조절하고, 아밀라아제 분비와 관련한 칼슘 신호 유발 자극의 강도를 조절한다[19,20]. 근세포 분화과정 동안 Homer1과 Homer2는 RyR을 통한 칼슘 분비 증가에 의해 nuclear factor of activated T cells type c1 (NFATc1)-의존성 신호기전을 활성화하고[21], T 림프구와 파골세포에서 Homer2와 Homer3는 calcineurin과 경쟁적으로 NFAT에 결합하여 T 세포의 활성 및 파골세포 분화 조절에 관여한다는 것이 밝혀졌다[22-24]. 이렇게 다양한 연구 결과에도 불구하고, 비흉분성 세포에서 CRAC 채널들의 활성을 통해 발생하는 칼슘 신호에서의 Homer 단백질의 역할과 기능에 대해서는 여전히 명확히 알려져 있지 않다. 본 연구에서는 Homer2 유전자 제거(Homer2^{-/-}) 마우스 및 Homer2 DNA를 이용하여 비흉분성 세포에서 SOCE를 매개하는 CRAC 채널들과 Homer2의 상호 조절작용을 통해 유도되는 칼슘 신호 조절기전에서 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)와 pyruvic acid는 Amresco (Solon, OH, USA)에서 구입하였으며,

thapsigargin (Tg)은 Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY, USA)에서 구입하였다. 2-Aminoethoxydiphenyl borate (2APB)는 Tocris Bioscience (Bristol, UK)에서 구입하였으며, Collagenase type IV, soybean trypsin inhibitor, N-[2-hydroxyethyl] piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid] (HEPES), gadolinium (Gd^{3+}) chloride, lanthanum (La^{3+}) chloride, D-glucose 및 그 외 시약들은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

2. 실험동물

대조군(wild-type, WT)과 Homer2^{-/-} 마우스는 선행 연구에서 제작/사용되었던 실험동물(25-28 g)을 사용하였으며[18-20], 모든 실험 동물들은 연세대학교 치과대학 동물실에서 12시간 주/야 순환 주기와 일정한 온도, 습도를 유지하면서 사료와 물을 자유로이 공급하며 사육되었다. 모든 실험은 연세대학교 실험동물 윤리위원회(IACUC 승인 번호 2010-0211)의 윤리규정에 따라 진행하였다.

3. 췌장의 선세포 분리

췌장의 선세포 분리는 콜라게네이즈 분해법(collagenase digestion)을 이용하여 선행연구에서 사용된 방법을 응용하여 실시하였다[18-20]. 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 배양 및 플라즈미드 DNA 형질 주입(transfection)

HEK293 세포(Korean Cell Line Bank, Korea)는 10% fetal bovine serum (Invitrogen, Waltham, MA, USA)과 100 units/mL penicillin/streptomycin이 들어간 세포 배양액(Dulbecco's modified Eagle's medium, Invitrogen)을 사용하여 5% CO_2 상태를 유지하며 세포 배양기에서 배양되었다. 배양된 HEK293 세포는 $1-5 \times 10^5$ 정도의 세포를 35-mm 세포 배양 접시에 커버슬립을 넣은 후 항생제가 들어가지 않은 배양액과 함께 넣어 준비하였다. 다음 날, 플라즈미드 DNA는 형질 주입을 위한 화합물질(transfection reagent)인 Lipofectamine 2000 (Invitrogen)과 Opti-MEM을 매뉴얼에 따라 혼합하여 상온에서 20분간 유지한 후 세포 배양액을 첨가하여 형질 주입 38-48시간이 지난 후 실험에 사용하였다.

5. $[Ca^{2+}]_i$ 측정

$[Ca^{2+}]_i$ 의 변화를 측정하기 위하여 대조군과 Homer2^{-/-} 마우스에서 분리한 췌장 선세포는 생리식염수에서 5 μ 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 ± 표준오차(mean ± S.E.)로 표시하였다. 각 수치 값의 통계적 유의성 검증은 독립 t-test를 시행하였으며, $p < 0.05$ 에서 통계적으로 유의하다고 평가하였다.

Results

1. 취장 선세포에서 Homer2에 의한 SOCE 변화 양상

이전 연구들에서 Homer2 유전자의 결여는 칼슘 신호 관련 단백질과 채널들의 발현 및 이들을 통한 칼슘 신호의 변화를 유발하였다[17-20]. 이에 외부 칼슘이 없는 환경의 대조군(WT)과 Homer2^{-/-} 마우스의 취장 선세포에서 2 μM Tg 자극에 의해 저장고 칼슘을 고갈시켜 세포질로 나오는 $[Ca^{2+}]_i$ 과 2 mM 외부 칼슘 자극에 의해 세포 내로 유입되는 $[Ca^{2+}]_i$ 를 측정하였다. 그 결과, 대조군과 Homer2^{-/-} 선세포에서 SOCE 활성화에 의해 유입된 칼슘 반응은 대조군보다 확연히 증가되었으나(WT 0.046 ± 0.003 vs. Homer2^{-/-} 0.128 ± 0.008, 2.78배 증가), 2 mM 외부 칼슘 자극에 의한 $[Ca^{2+}]_i$ 증가 효과는 대조군과 비교해 유의하게 줄어든 것(WT 0.191 ± 0.012 vs. Homer2^{-/-} 0.145 ±

0.007, 24.08% 감소)를 확인하였다(Fig. 1). 이러한 결과는 Homer2 단백질의 발현이 SOCE 활성화에 의한 $[Ca^{2+}]_i$ 의 조절에 관여하는 CRAC 채널들과 밀접한 연관성이 있음을 나타낸다.

다음으로 SOCE 활성을 통한 칼슘 유입을 억제하는 것으로 알려진 억제제들을 사용하여 세포 내로 유입되는 칼슘의 변화를 조사하였다. 2 mM 외부 칼슘 자극과 함께 IP₃ 수용체와 SOCE 활성을 통한 칼슘 유입 작용을 저해하는 것으로 알려진 2APB를 처리한 후 $[Ca^{2+}]_i$ 를 측정된 결과, 대조군과 Homer2^{-/-} 선세포에서의 $[Ca^{2+}]_i$ 증가 반응은 Fig. 1B의 결과와 비교하여 2APB에 의한 억제 효과를 유의하게 나타냈으며(WT 49.74% 감소; Homer2^{-/-} 73.79% 감소), 대조군에 비해 Homer2^{-/-} 선세포에서 칼슘 유입이 확연히 줄어든 것으로 나타났다(Fig. 2A and 2D). 반면, 비특이적 SOCE 활성을 통한 칼슘 유입 및 CRAC 채널의 억제제인 Gd³⁺를 처리한 후, Homer2^{-/-} 선세포에서의 외부 칼슘 자극에 의한 $[Ca^{2+}]_i$ 증가는 대조군에 비해 Gd³⁺에 의한 칼슘 유입 억제 영향을 받지 않았음(WT 73.82% 감소; Homer2^{-/-} 8.97% 감소)를 확인하였다(Fig. 2B and 2D). 또한, Gd³⁺와 유사하게 비특이적 SOCE 활성을 통한 칼슘 유입과 CRAC 채널의 억제 및 칼슘 채널 저해제인 La³⁺를 처리한 후 $[Ca^{2+}]_i$ 를 측정된 결과, 대조군의 취장 선세포에서는 $[Ca^{2+}]_i$ 유입이 현저히 감소된 반면, Homer2^{-/-} 세포에서는 La³⁺에 의한 칼슘 유입 억제 영향을 거의 받지 않았음(WT 84.82% 감소; Homer2^{-/-} 37.24% 감소)를 확인하였다(Fig. 2C and 2D). 이러한 결과들은 SOCE 활성화에 의한 $[Ca^{2+}]_i$ 의 조절에 관여하는 CRAC 채널들과 칼슘 채널 간의 활성 조절과 Homer2 발현 정도와의 긴밀한 상관성이 있음을 시사한다.

2. Homer2에 의한 CRAC 채널의 활성화와 SOCE 반응의 조절

Homer2 단백질 발현 조절에 따른 SOCE 활성을 통한 칼슘 유입 조절에 대한 영향을 조사하기 위해, HEK293 세포에 Homer2 DNA를 형질

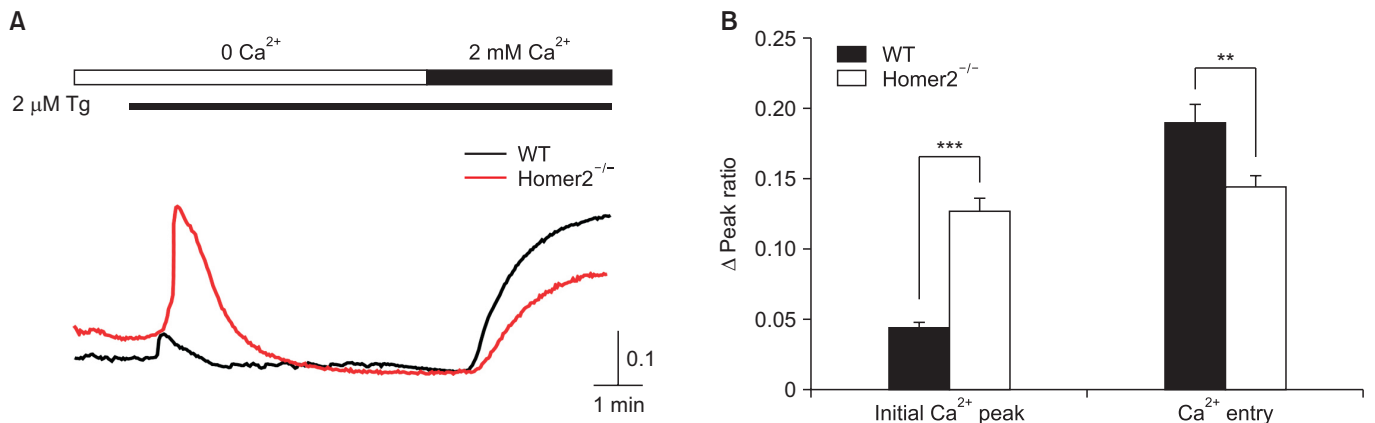


Fig. 1. The effect of thapsigargin (Tg)-activated store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) in pancreatic acinar cells from wild-type (WT) and Homer2^{-/-} mice. (A) Application of 2 μM Tg increased a $[Ca^{2+}]_i$ in Ca^{2+} -free environments (initial Ca^{2+} peak, WT 0.046 ± 0.003, n = 125; Homer2^{-/-} 0.128 ± 0.008, n = 125) and changes of the Ca^{2+} entry by 2 mM Ca^{2+} (Ca^{2+} entry, WT 0.191 ± 0.012; Homer2^{-/-} 0.145 ± 0.007) were significant in pancreatic acinar cells between WT and Homer2^{-/-} mice. (B) The bar graph was presented the magnitude of Ca^{2+} entry by the stimulation of 2 μM Tg and 2 mM Ca^{2+} between WT and Homer2^{-/-} mice. Data are presented as mean ± S.E.

** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared to the Ca^{2+} entry in WT cells.

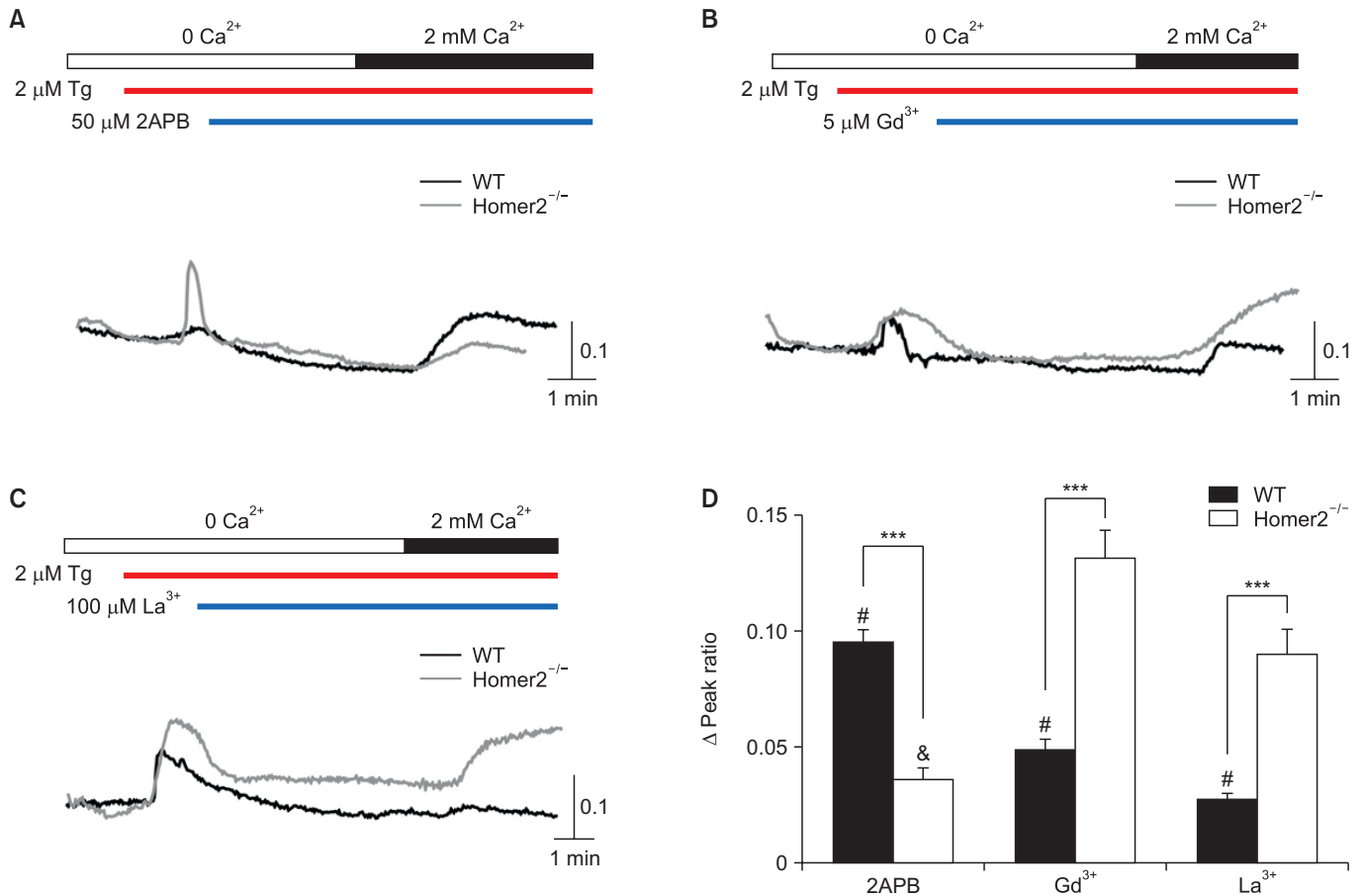


Fig. 2. Inhibitory effects of various blockers for thapsigargin (Tg)-activated store-operated Ca²⁺ entry (SOCE) in pancreatic acinar cells from wild-type (WT) and Homer2^{-/-} mice. (A) 50 μM 2-Aminoethoxydiphenyl borate (2APB) as an IP₃ receptor antagonist and SOCE inhibitor, was partially inhibited for the Ca²⁺ entry between WT and Homer2^{-/-} mice (WT 0.096 ± 0.005, n = 96; Homer2^{-/-} 0.038 ± 0.004, n = 20). (B) Low concentrations (1–5 μM) of gadolinium (Gd³⁺) has been commonly used to block SOCE. 5 μM Gd³⁺ was significantly remained the Ca²⁺ entry without the reduction of [Ca²⁺]_i in Homer2^{-/-} pancreatic acinar cells as a compared to WT cells (WT 0.050 ± 0.004, n = 52; Homer2^{-/-} 0.132 ± 0.011, n = 36). (C) Lanthanum (La³⁺) is also a potent TRPC blocker and a SOCE inhibitor, however high concentrations (> 100 μM) of La³⁺ has act to inhibit both the entry and efflux of Ca²⁺ ions by blocking of PMCA activities. 100 μM La³⁺ was completely inhibited the Ca²⁺ entry in pancreatic acinar cells from WT mice but not in Homer2^{-/-} cells (WT 0.029 ± 0.002, n = 63; Homer2^{-/-} 0.091 ± 0.010, n = 24). (D) The bar graph was presented the magnitude of Ca²⁺ entry by the stimulation of various blockers between WT and Homer2^{-/-} mice. Data are presented as mean ± S.E.

IP₃, inositol 1,4,5-triphosphate; TRPC, transient receptor potential canonical; PMCA, plasma membrane Ca²⁺-ATPase.

#p < 0.001 and &p < 0.001 compared to the Ca²⁺ entry by the stimulation of 2 mM Ca²⁺ in WT and Homer2^{-/-} cells. ***p < 0.001 compared to the Ca²⁺ entry in WT and Homer2^{-/-} cells.

주입 방법으로 세포 내 과발현시킨 후 대조군 HEK293 세포(Empty)와 함께 SOCE 반응 조절에 대한 영향을 조사하였다. 외부 칼슘이 없는 환경에서 2 μM Tg 자극에 의해 ER의 칼슘 고갈 후 증가된 [Ca²⁺]_i의 크기는 대조군에 비해 Homer2 과발현 세포(H2)에서 유의하게 증가된 것을 확인하였다(Empty 0.044 ± 0.007 vs. H2 0.068 ± 0.004, 1.55배 증가). 이후 2 mM 외부 칼슘 자극에 의해 세포 내로 유입되는 [Ca²⁺]_i를 측정할 결과, Homer2 과발현 세포에서 세포 내로 유입된 [Ca²⁺]_i 크기가 대조군 세포에 비해 소량 줄어든(Empty 0.164 ± 0.004 vs. H2 0.152 ± 0.004, 7.32% 감소) 것을 확인하였다(Fig. 3A–3C). 또한, 대조군 HEK293 세포와 Homer2 과발현 세포에서 외부 칼슘 자극에 의해 세포 내로 유입된 [Ca²⁺]_i은 Fig. 3C의 결과와 비교하여 Gd³⁺에 의

한 SOCE 및 CRAC 채널의 억제작용을 유의하게 받지 않았음(Empty 52.44% 감소; H2 39.47% 감소)을 확인하였다(Fig. 3A, 3B, and 3D).

CRAC 채널에 의한 SOCE 반응 조절 작용에서 Homer2의 영향을 확인하기 위해 HEK293 세포에 CRAC 채널인 Orai1과 STIM1 DNA를 형질 주입 방법을 이용해 Homer2 DNA와 함께 과발현시킨 후 2 mM 외부 칼슘 자극에 의한 [Ca²⁺]_i 증가 효과 및 Gd³⁺에 의한 [Ca²⁺]_i 증가 억제 정도를 비교하였다. Orai1과 STIM1 과발현 세포(O1 + S1)와 Orai1, STIM1 및 Homer2 과발현 세포(H2 + O1 + S1) 모두에서 SOCE 활성을 통한 세포 내 [Ca²⁺]_i 증가는 Homer2 과발현 세포와 비교해 현저히 증가되는 것(O1 + S1 2.81배 증가; H2 + O1 + S1 2.13

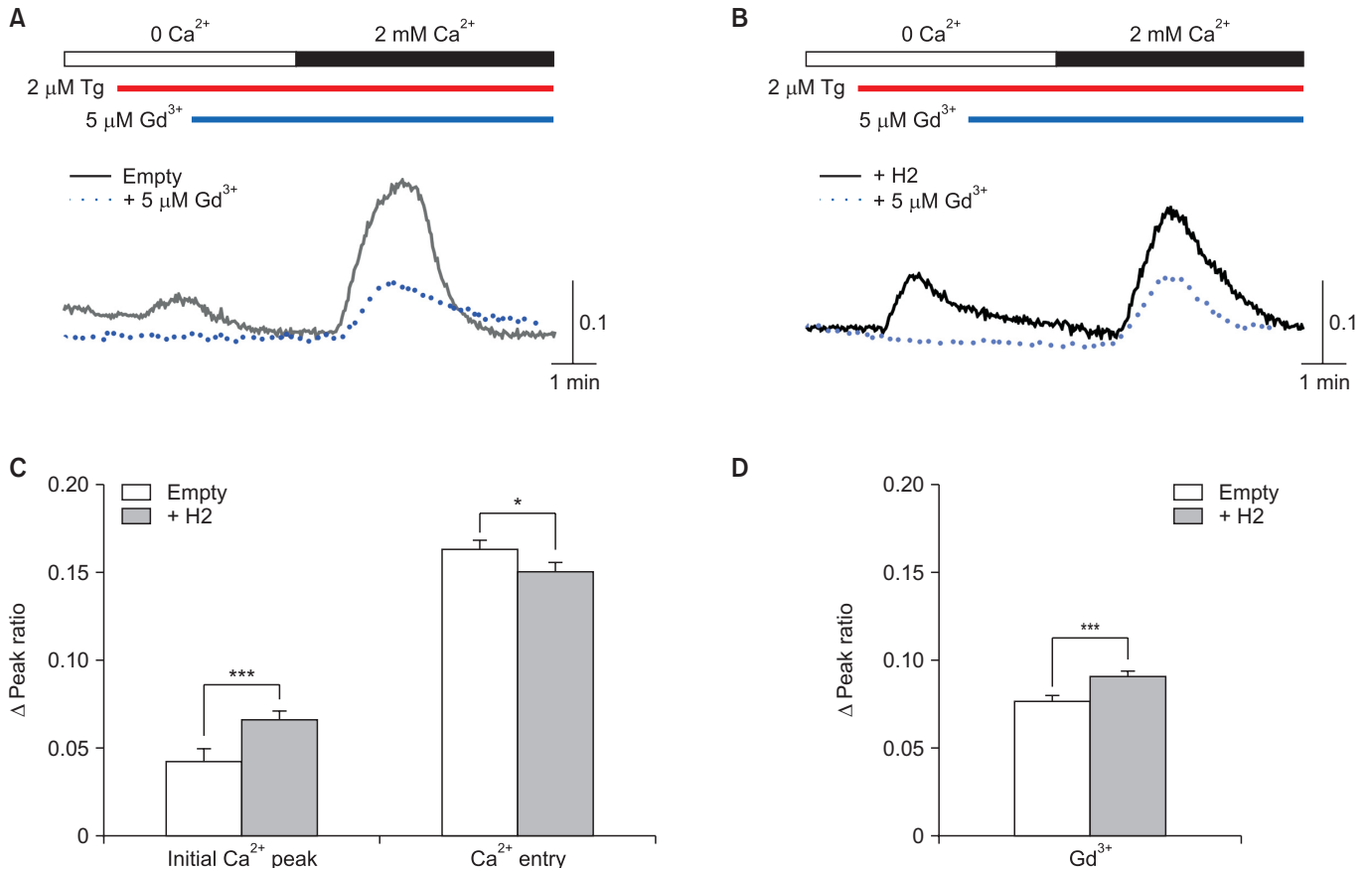


Fig. 3. Effects of expressed the Homer2 (H2) cDNA to thapsigargin (Tg)-induced store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) in HEK293 cells (Empty). (A and B) Application of 2 μM Tg increased a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Ca^{2+} -free environments (initial Ca^{2+} peak, Empty 0.044 ± 0.007 , $n = 152$; H2 0.068 ± 0.004 , $n = 321$) and changes of the Ca^{2+} entry by 2 mM Ca^{2+} (Ca^{2+} entry, Empty 0.164 ± 0.004 ; H2 0.152 ± 0.004) were still remained by 5 μM gadolinium (Gd^{3+}) in HEK293 cells and transfected H2 cells (Empty 0.078 ± 0.002 , $n = 161$; H2 0.092 ± 0.002 , $n = 250$). (C and D) Bar graphs were presented the magnitude of Ca^{2+} entry by the stimulation of 2 μM Tg, 2 mM Ca^{2+} , and 5 μM Gd^{3+} in 2 mM Ca^{2+} between HEK293 and H2 cells. Data are presented as mean \pm S.E.

* $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ compared to the Ca^{2+} entry in HEK293 cells.

배 증가)을 확인하였으며, 이러한 SOCE 활성화에 의한 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 증가 반응은 Gd^{3+} 처리에 의해 완벽하게 억제되는 것(O1 + S1 85.48% 감소; H2 + O1 + S1 80.50% 감소)을 확인하였다(Fig. 4). 이러한 결과들을 통해 CRAC 채널들의 과발현은 SOCE 활성화 반응에 의한 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 의 유입을 급격히 촉진시키고, Homer2 발현에 의해 제한적으로 억제 조절 작용이 활성화될 가능성이 있음을 보여준다.

Discussion

본 연구는 쥐장 선세포와 HEK293 세포에서 Homer2의 발현 조절을 통해 칼슘 저장고의 고갈에 의한 SOCE 활성화 시 세포 내로 유입되는 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 이 조절되며, 다양한 SOCE 억제제들을 사용하여 Homer2가 CRAC 채널들과 상호작용하여 SOCE를 조절할 가능성이 있음을 간접적으로 제시하였다.

이전의 연구들은 SOCE와 CRAC 채널의 활성화 시 신호 조절자로서 Homer1의 역할 및 작용 기전 규명에 대한 연구가 주를 이루었다.

EVH1 도메인의 PPXF 모티프를 지닌 TRPC 채널들(특히, TRPC1)과 IP_3 수용체들 사이의 물리적 연결은 어댑터 단백질인 Homer 단백질들에 의해 촉진되어 TRPC1-Homer- IP_3 수용체 복합체를 이루며, TRPC1 채널이 활성화되어 열리면 이 결합은 해제되고 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 증가 반응이 나타난다[12]. 또한, 사람의 혈소판 세포에서 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 조절 시 TRPC1과 IP_3R 의 EVH1 도메인을 통해 Homer1과 직접 결합하여 TRPC1-Homer1- IP_3R 복합체를 형성한 후 자극에 의해 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 를 증가시키지만 STIM1의 EVH1 도메인에 결합한 Homer1과 간접적으로 결합한 Orai1이 복합체를 형성하여 SOCE 활성을 통해 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 를 증가시키며, 이때 Homer1은 초기 칼슘 유입 반응보다 이후 반응을 지속시키는 역할을 담당한다고 보고되었다[14]. 이와 비슷하게 혈관 평활근 세포에서 SOCE 활성화 자극을 통한 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 증가 반응은 Homer1이나 STIM1의 활성화 억제에 의해 감소되며, 이 과정에서 형성되는 Orai1-Homer1-TRPC 채널들의 복합체는 Homer1과 STIM1의 EVH1 도메인에 직접 결합한 이후 Homer1과 Orai1이 간접적으로 결합을 이루며 SOCE 반응을 활성화시킨다[16]. 그러나, $\text{Ca}_v1.2$ -Homer1-STIM1 복합체에

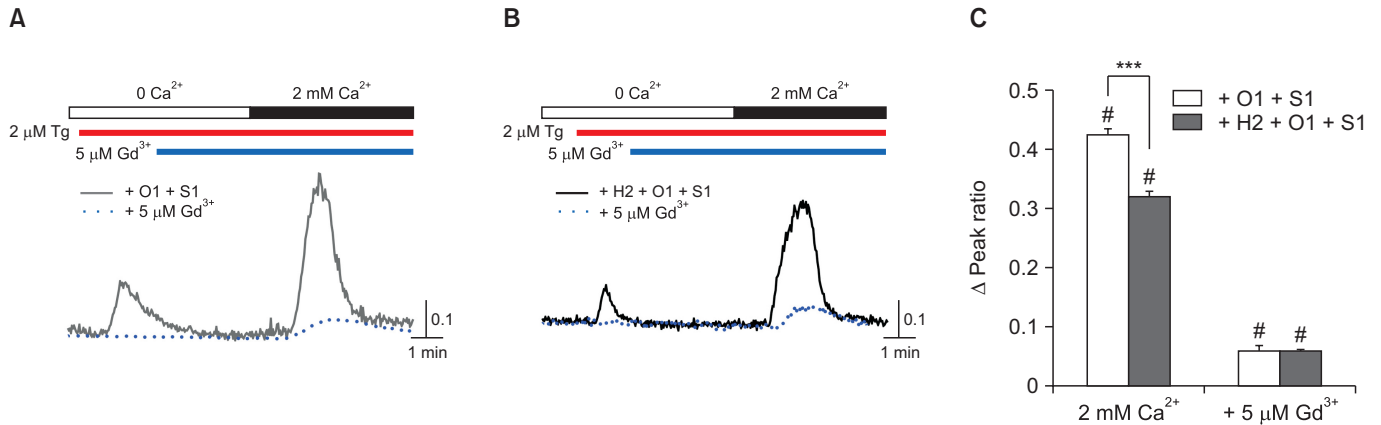


Fig. 4. The inhibitory effect of gadolinium (Gd^{3+}) for thapsigargin (Tg)-activated store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) in expressed Orai1, Stim1, and Homer2 cDNA cells. (A) Increases of the Ca^{2+} entry by 2 mM Ca^{2+} (2 mM Ca^{2+} , 0.427 ± 0.005 , $n = 271$) was significantly reduced by 5 μM Gd^{3+} (5 μM Gd^{3+} , 0.062 ± 0.007 , $n = 59$) in transfected Orai1 and Stim1 cells (O1 + S1). (B) Changes of the Ca^{2+} entry by 2 mM Ca^{2+} in transfected Orai1, Stim1, and Homer2 cells (H2 + O1 + S1, 2 mM Ca^{2+} , 0.323 ± 0.005 , $n = 464$) was smaller than O1 + S1 cells, however the inhibitory effect by 5 μM Gd^{3+} (5 μM Gd^{3+} , 0.063 ± 0.002 , $n = 192$) was similarly reduced as a compared to O1 + S1 cells. (C) The bar graph was presented the magnitude of Ca^{2+} entry by the stimulation of 2 mM Ca^{2+} and 5 μM Gd^{3+} between transfected O1 + S1 and H2 + O1 + S1 cells. Data are presented as mean \pm S.E.

$p < 0.001$ compared to the Ca^{2+} entry by the stimulation of 2 mM Ca^{2+} in transfected H2 cells. *** $p < 0.001$ compared to the Ca^{2+} entry in transfected O1 + S1 and H2 + O1 + S1 cells.

서 Homer1의 활성을 억제하면 칼슘 저장고 고갈에 의한 SOCE 자극 시 STIM1과 결합한 $Ca_v1.2$ 를 통해 $[Ca^{2+}]_i$ 가 증가된다[10]는 보고 및 HT-22 신경세포에서 Homer1a-STIM1 복합체는 SOCE 활성 자극에 대한 $[Ca^{2+}]_i$ 증가 반응을 감소시키고, Homer1의 활성 억제를 통해 이러한 억제 반응이 사라진다[25]는 보고도 있다. 이처럼 Homer 단백질과 복합체를 구성하는 CRAC 채널들의 종류와 세포 종류에 따라 Homer 단백질의 역할은 달라진다. 본 연구진도 이전 연구들을 통해서 다양한 세포에서 Homer2 단백질의 다양한 조절 작용을 보고하였다. Homer1a는 PMCA의 PDZ (PSD-95/Dlg/ZO-1 domain) 도메인에 결합하여 PMCA 발현 증가 및 세포 내 칼슘 제거에 대한 속도 향상을 보이는 반면 Homer2 단백질은 PMCA의 PPXXF 유사 모티프 결합해 이러한 반응들을 억제하였고[19], Homer2가 생리학적 농도의 자극에 의해 발생된 칼슘 진동(oscillations)의 진폭(amplitude) 조절을 통해 타액 분비 기능을 조절하며[20], TRPC3, TRPC6와 Orai1의 발현을 조절하여 수용체 활성조절을 통한 세포 내 칼슘 유입을 조절할 수 있음을 확인하였다[18].

SOCE를 통한 세포 내 칼슘 조절은 세포의 다양한 기능 수행 및 세포의 분화, 성장과 사멸 조절과 밀접한 관련이 있다. 따라서, SOCE 조절 이상이 발생할 경우 심각한 질환들을 초래할 수 있다. 특히, SOCE 신호 기전에서 주요 인자로 알려진 STIM1은 CRAC 채널인 Orai 채널과 SOC 채널인 TRPC 채널과의 결합을 통해 칼슘 신호를 조절할 뿐만 아니라, $Ca_v1.2$ 나 $Ca_v1.3$ 와 같은 L-type 전압개폐(voltage-gated) 칼슘 채널이나 AMPA 수용체와 NMDA 수용체 같은 수용체/리간드 활성(receptor/ligand-activated) 칼슘 채널들도 STIM1과 SOCE를 조절한다[26-28]. Homer 단백질도 이러한 CRAC/SOC 채널들과의 결합을 통해 SOCE 신호 기전을 조절하는데, 이때 STIM1의 PPXXF 모티프와 Homer 단백질의 결합이 이루어졌을 경우에만 정상적인 칼슘 조절

기능을 수행한다고 보고되었다[10,14,16,25]. SOCE와 관련 CRAC/SOC 채널들에 대한 연구를 위해 다양한 억제제들을 사용한다. 2APB는 Orai1-STIM1 복합체의 발현 증가로 SOCE 활성이 되었을 때나 dimer 상태의 STIM1이 아닌 STIM1의 SOAR와 coiled-coil 1 부위의 결합 강화에 의한 multimerization 형성에 의한 SOCE 작용 활성 상태일 때, 그리고 STIM1과의 결합이 활성화된 Orai1을 억제하여 SOCE 활성을 억제한다[29,30]. 그러나, Orai1과 Orai3의 활성에 의한 칼슘 유입 증가 현상에 대해서는 억제 작용을 보이지 않는다고 알려져 있다[31]. 또한, lanthanide 계열의 Gd^{3+} 와 La^{3+} 는 농도에 따라 Orai1의 활성을 직접적으로 억제하거나, 전압개폐 칼슘 채널과 TRP 채널들의 활성을 억제할 수 있다고 알려져 있다[30,32]. 따라서, 이러한 억제제들을 사용한 본 실험의 결과는 Homer2가 Orai1/STIM1 복합체의 활성을 조절하며, 쥐장 선세포에 발현된 TRP 채널들과 L-type 전압개폐 칼슘 채널들과의 상호작용을 통해 SOCE 신호 기전을 조절할 가능성이 있음을 제시하였다. 본 논문은 비흥분성 분비 세포에서 Homer2 단백질이 ER 칼슘 고갈에 의한 SOCE 활성 시 Orai/STIM1 복합체의 활성을 직접적으로 조절하며, 이 외 SOC 채널 활성의 간접적 조절을 통해 다양한 칼슘 신호전달 패턴을 보여준다. 이러한 연구결과는 분비 조직에서 세포 내 칼슘 조절 이상으로 발생하는 체액의 분비 이상이나 염증성 질환 등의 병리 원인과 기전 규명 관련 연구에 큰 도움이 될 것으로 생각한다.

Acknowledgements

이 논문은 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(NRF-2015R1D1A1A01057277; NRF-2020R1A2C1004942; NRF-2022R1G1A1004843).

Conflicts of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was

reported.

References

- 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.
- Parekh AB, Putney JW Jr. Store-operated calcium channels. *Physiol Rev* 2005;85:757–810. doi: 10.1152/physrev.00057.2003.
- Zhang SL, Yu Y, Roos J, Kozak JA, Deerinck TJ, Ellisman MH, Stauderman KA, Cahalan MD. STIM1 is a Ca²⁺ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca²⁺ store to the plasma membrane. *Nature* 2005;437:902–5. doi: 10.1038/nature04147.
- Peinelt C, Vig M, Koomoa DL, Beck A, Nadler MJ, Koblan-Huberson M, Lis A, Fleig A, Penner R, Kinet JP. Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1). *Nat Cell Biol* 2006;8:771–3. doi: 10.1038/ncb1435.
- Soboloff J, Spassova MA, Tang XD, Hewavitharana T, Xu W, Gill DL. Orai1 and STIM1 reconstitute store-operated calcium channel function. *J Biol Chem* 2006;281:20661–5. doi: 10.1074/jbc.C600126200.
- Yuan JP, Zeng W, Huang GN, Worley PF, Muallem S. STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels. *Nat Cell Biol* 2007;9:636–45. doi: 10.1038/ncb1590.
- Zeng W, Yuan JP, Kim MS, Choi YJ, Huang GN, Worley PF, Muallem S. STIM1 gates TRPC channels, but not Orai1, by electrostatic interaction. *Mol Cell* 2008;32:439–48. doi: 10.1016/j.molcel.2008.09.020.
- Yuan JP, Zeng W, Dorwart MR, Choi YJ, Worley PF, Muallem S. SOAR and the polybasic STIM1 domains gate and regulate Orai channels. *Nat Cell Biol* 2009;11:337–43. doi: 10.1038/ncb1842.
- Wang Y, Deng X, Mancarella S, Hendron E, Eguchi S, Soboloff J, Tang XD, Gill DL. The calcium store sensor, STIM1, reciprocally controls Orai and CaV1.2 channels. *Science* 2010;330:105–9. doi: 10.1126/science.1191086.
- Dionisio N, Smani T, Woodard GE, Castellano A, Salido GM, Rosado JA. Homer proteins mediate the interaction between STIM1 and Cav1.2 channels. *Biochim Biophys Acta* 2015;1853:1145–53. doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.02.014.
- Kiselyov K, Mignery GA, Zhu MX, Muallem S. The N-terminal domain of the IP3 receptor gates store-operated hTrp3 channels. *Mol Cell* 1999;4:423–9. doi: 10.1016/s1097-2765(00)80344-5.
- 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 IP3 receptors. *Cell* 2003;114:777–89. doi: 10.1016/s0092-8674(03)00716-5.
- Worley PF, Zeng W, Huang G, Kim JY, Shin DM, Kim MS, Yuan JP, Kiselyov K, Muallem S. Homer proteins in Ca²⁺ signaling by excitable and non-excitable cells. *Cell Calcium* 2007;42:363–71. doi: 10.1016/j.ceca.2007.05.007.
- Jardin I, Albarrán L, Bermejo N, Salido GM, Rosado JA. Homers regulate calcium entry and aggregation in human platelets: a role for Homers in the association between STIM1 and Orai1. *Biochem J* 2012;445:29–38. doi: 10.1042/BJ20120471.
- Brakeman PR, Lanahan AA, O'Brien R, Roche K, Barnes CA, Haganir RL, Worley PF. Homer: a protein that selectively binds metabotropic glutamate receptors. *Nature* 1997;386:284–8. doi: 10.1038/386284a0.
- Jia S, Rodriguez M, Williams AG, Yuan JP. Homer binds to Orai1 and TRPC channels in the neointima and regulates vascular smooth muscle cell migration and proliferation. *Sci Rep* 2017;7:5075. doi: 10.1038/s41598-017-04747-w.
- 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 PLCbeta GAP activities. *J Cell Biol* 2003;162:293–303. doi: 10.1083/jcb.200210109.
- Kang JY, Kang N, Yang YM. Regulation of the expression and function of TRPCs and Orai1 by Homer2 in mouse pancreatic acinar cells. *Int J Oral Biol* 2021;46:134–9. doi: 10.11620/IJOB.2021.46.3.134.
- Yang YM, Lee J, Jo H, Park S, Chang I, Muallem S, Shin DM. Homer2 protein regulates plasma membrane Ca²⁺-ATPase-mediated Ca²⁺ signaling in mouse parotid gland acinar cells. *J Biol Chem* 2014;289:24971–9. doi: 10.1074/jbc.M114.577221.
- Kang N, Kang JY, Shin DM, Yang YM. Homer2 regulates amy-

- lase 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.
21. 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.
 22. 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.
 23. 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.
 24. 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.
 25. Rao W, Peng C, Zhang L, Su N, Wang K, Hui H, Dai SH, Yang YF, Luo P, Fei Z. Homer1a attenuates glutamate-induced oxidative injury in HT-22 cells through regulation of store-operated calcium entry. *Sci Rep* 2016;6:33975. doi: 10.1038/srep33975.
 26. Soboloff J, Rothberg BS, Madesh M, Gill DL. STIM proteins: dynamic calcium signal transducers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012;13:549–65. doi: 10.1038/nrm3414.
 27. Lopez JJ, Albarran L, Gómez LJ, Smani T, Salido GM, Rosado JA. Molecular modulators of store-operated calcium entry. *Biochim Biophys Acta* 2016;1863:2037–43. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.04.024.
 28. Serwach K, Gruszczynska-Biegala J. Target molecules of STIM proteins in the central nervous system. *Front Mol Neurosci* 2020;13:617422. doi: 10.3389/fnmol.2020.617422.
 29. Wei M, Zhou Y, Sun A, Ma G, He L, Zhou L, Zhang S, Liu J, Zhang SL, Gill DL, Wang Y. Molecular mechanisms underlying inhibition of STIM1–Orai1-mediated Ca²⁺ entry induced by 2-aminoethoxydiphenyl borate. *Pflugers Arch* 2016;468: 2061–74. doi: 10.1007/s00424-016-1880-z.
 30. Tian C, Du L, Zhou Y, Li M. Store-operated CRAC channel inhibitors: opportunities and challenges. *Future Med Chem* 2016;8:817–32. doi: 10.4155/fmc-2016-0024.
 31. 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.
 32. Clapham DE, Runnels LW, Strübing C. The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci* 2001;2:387–96. doi: 10.1038/35077544.