

## Original Article

Int J Oral Biol 45:126-133, 2020  
 pISSN: 1226-7155 • eISSN: 2287-6618  
<https://doi.org/10.11620/IJOB.2020.45.3.126>

# Deficiencies of Homer2 and Homer3 accelerate aging-dependent bone loss in mice

Jung Yun Kang<sup>1,2†</sup>, Namju 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

Homer proteins are scaffold proteins that regulate calcium ( $Ca^{2+}$ ) signaling by modulating the activity of multiple  $Ca^{2+}$  signaling proteins. In our previous report, Homer2 and Homer3 regulated NFATc1 function through its interaction with calcineurin, which then acted to regulate receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL)-induced osteoclastogenesis and bone metabolism. However, to date, the role of Homers in osteoclastogenesis remains unknown. In this study, we investigated the roles of Homer2 and Homer3 in aging-dependent bone remodeling. Deletion of *Homer2/Homer3* (*Homer2/3 DKO*) markedly decreased the bone density of the femur. The decrease in bone density was not seen in mice with *Homer2* (*Homer2<sup>-/-</sup>*) and *Homer3* (*Homer3<sup>-/-</sup>*) deletion. Moreover, RANKL treatment of bone marrow-derived monocytes/macrophages in *Homer2/3 DKO* mice significantly increased the formation of multinucleated cells and resorption areas. Finally, *Homer2/3 DKO* mice decreased bone density in an aging-dependent manner. These findings suggest a novel potent mode of bone homeostasis regulation through osteoclasts differentiation during aging by Homer proteins, specifically Homer2 and Homer3.

**Keywords:** Osteoclastogenesis, Homer scaffolding proteins, Osteoporosis, Aging

## Introduction

뼈는 역동적인 조직으로 파골세포(osteoclast)에 의한 뼈 재흡수(resorption)와 조골세포(osteoblast)에 의한 뼈 생성의 균형을 이루며 생의 전반 동안 지속적으로 리모델링을 진행한다. 성인의 골격계에서 뼈의 재흡수와 생성 간의 조화를 통해 골량(bone mass)의 유지 및 골질(bone quality)을 보존하며, 매년 뼈 조직의 10% 가량이 새롭게 교체된다. 그러나, 병리학적 상태에서의 과도한 파골세포의 분화 및 뼈의 재흡수는 골다공증, 류마티즘, 치주염, 뼈 암과 같은 골격계 질환들을 유발하며, 이들 질환은 주요 건강 문제 및 사회-경제적 부담으로 나타난다[1-3]. 골수유래 단핵구/대식세포(bone marrow-derived monocytes/macrophage, BMMs)에서 다행의 성숙된 파골세포로의 분화 동안 조골세포에서 분비되는 receptor activator of nuclear

factor-kappa B ligand (RANKL)과 조혈 줄기 세포(hematopoietic stem cells)의 증식 및 대식세포로 분화를 유도하는 시토카인(cytokine)인 macrophage-colony-stimulating factor (M-CSF)가 필수 인자로 작용한다[2]. RANKL에 의한 RANK 수용체의 활성은 세포 내 칼슘 농도( $[Ca^{2+}]$ )를 주기적 진동(oscillations)의 형태로 나타나게 한다[4].  $[Ca^{2+}]$  진동은 G-단백의 활성, 특히 Gq 단백의 활성과 관련이 있다. Gq 단백은 phospholipase C (PLC)를 활성화시켜 inositol 1,4,5-triphosphate ( $IP_3$ )를 생성한다[5,6]. 이렇게 생성된  $IP_3$ 는 세포질그물망(endoplasmic reticulum)에 있는  $IP_3$  수용체를 활성화하여 세포질그물에 저장된 칼슘 분비를 통해  $[Ca^{2+}]$ 를 증가시키고, 세포질그물망 칼슘 센서인 stromal interaction molecule 1 (STIM1)과 형질막(plasma membrane)의 Orai와 transient receptor potential canonical (TRPC) 채널들이 클러스터를 형성하며 활성화되어 세포 밖

Received August 10, 2020; Revised August 14, 2020; Accepted August 20, 2020

\*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.

의 칼슘을 세포 내로 유입한다[7]. 이렇게 증가된  $[Ca^{2+}]$ 은 칼슘 배출 기전을 활성화시켜 sarco/endoplasmic  $Ca^{2+}$ -ATPase (SERCA)와 plasma membrane  $Ca^{2+}$ -ATPase (PMCA)를 통해 세포질 밖으로 칼슘을 이동시켜 기저 수준의  $[Ca^{2+}]$ 로 회복된다[8]. 일련의 과정들을 통해 RANKL에 의한  $[Ca^{2+}]$  진동은 인산분해효소(phosphatase)인 칼시뉴린(calcineurin)을 활성화시켜 nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic 1 (NFATc1) 단백의 발현 촉진 및 핵 전위 유발을 통해 파골세포의 분화과정에서 다핵세포의 형성 및 뼈의 재흡수를 촉진시킨다 [4,9–16].

세포 내 칼슘은 세포의 성장과 분화, 사멸(apoptosis)과 같은 다양한 세포의 기능과 역할을 수행하는 보편적인 세포 내 메신저이다[17,18]. 또한, NFAT 단백 그룹도 세포 주기 진행, 유전자 발현 및 세포 사멸과 같은 중요한 기능을 담당하며, 칼슘/NFAT 신호 전달경로는 정상적인 세포의 생리학적 기능을 유지하기 위해 필수적이다[19–21]. 특히, 칼슘에 의존적인 칼시뉴린의 활성 억제는 NFAT의 활성 및 기능 억제를 유도하며, 결과적으로 칼슘 신호의 파괴가 RANKL의 기능, NFATc1의 활성 및 뼈 대사에서의 작용기전을 변화시킬 수 있다[4,15,22,23]. 칼시뉴린/NFAT 신호 전달경로에서 NFAT의 기능을 조절할 수 있는 다양한 어댑터 단백들이 보고되었다[24–28]. 이들 중 스캐폴드 단백인 Homer 그룹은 여러 개의 스플라이싱 변이들을 통해 Homer1, Homer2, Homer3로 분류된다. 이 중, 짧은 형태의 Homer1a는 신경세포에서 지속적 자극에 의해 직접적으로 발현되는 초기 유전자 생산물로 발견되었고, Homer1a를 제외한 모든 Homer 단백들은 긴 형태를 지니고 있으며, 중추신경계 전반에 고르게 발현되어 있다[29]. Homer 단백들은 N-말단에 Ena/VASP homology 1 (EVH1) 단백 결합 도메인과 C-말단에 coiled-coil 복합(multimerization) 도메인과 류신 지퍼(leucine zipper)를 가지고 있으며, 특히 EVH1 도메인은 일부 GPCR들, TRPC 채널들, IP<sub>3</sub> 수용체들, ryanodine 수용체들(RyRs), 그리고 스캐폴드 단백인 Shank 그룹 등과 결합을 할 수 있는 곳이다[30]. Homer 단백은 신경 세포의 시냅스 활성을 조절하는 시냅스 단백으로 알려졌으나, 이후 비활성 세포에서의 연구들을 통해 Homer1은 TRPC 채널과 IP<sub>3</sub> 수용체들의 결합을 도와 칼슘의 유입을 조절하고, Homer2는 혀장의 포상세포에서 G 단백과 PLC 활성 조절을 통해 GPCR들의 칼슘 신호 유발 자극 강도를 조절하며, 이하선 포상세포에서는 PMCA 와의 결합을 통해  $[Ca^{2+}]$ 를 조절한다는 것이 밝혀졌다[29–33]. 최근, 골격근에서 Homer2는 근세포 분화과정 동안 RyR을 통한 칼슘 분비를 증가시켜 NFATc1-의존적 신호 전달경로를 활성화시키고, Homer2와 Homer3가 T 림프구와 파골세포에서 칼시뉴린과 경쟁적으로 NFAT에 결합하여 T 세포의 활성 및 파골세포 분화를 조절한다고 보고되었다 [24,26,34]. 그럼에도 불구하고, 여전히 파골세포 분화 동안 RANKL에 의한 NFATc1의 신호 전달경로에서의 Homer 단백들의 역할과 작용 기전에 대해서는 명확히 알려져 있지 않다. 본 연구에서는 Homer2와 Homer3 유전자 제거 마우스를 이용하여 뼈 리모델링과 노화 과정에서 나타나는 뼈의 변화에 대한 Homer 단백의 역할과 영향을 알아보고자 하였다.

## Materials and Methods

### 1. 재료

모든 세포 배양 배지와 보충품들은 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였다. Soluble RANKL (sRANKL)와 M-CSF는 PeproTech (Rocky Hill, NJ, USA)에서 구입하였다.

### 2. 실험동물

대조군(wild-type, WT)과 *Homer2*, *Homer3*, 그리고 *Homer2/Homer3* 유전자 제거(*Homer2*<sup>-/-</sup>, *Homer3*<sup>-/-</sup>, *Homer2/3* DKO) 마우스는 Paul F. Worley 박사(Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, USA) [26,32]로부터 제공받아 선행 연구에서 제작/사용되었던 실험동물을 사용하였다[24,33]. 모든 실험동물들은 연세대학교 치과대학 동물실에서 12시간 주/야 순환 주기와 일정한 온도, 습도를 유지하면서 사료와 물을 자유로이 공급하며 사육되었고, 연세대학교 실험동물 윤리위원회(IACUC 승인 번호 2014-0067)의 윤리규정에 따라 실험하였다.

### 3. BMMs의 분리

1차 배양된 BMMs은 이전에 설명한대로 4–6주령 마우스의 대퇴골과 경골에서 분리되었다[24]. 대퇴골 및 경골의 골수로부터 유래된 모든 세포를 모아 10% fetal bovine serum 및 30 ng/mL M-CSF를 함유하는 α-minimum essential medium 배지에서 배양하였다. 다음날, 비접착 세포를 모아 적절한 플레이트에 파종하고 M-CSF로 처리하였다. 2일 후 비접착 세포는 phosphate buffered saline로 세척 후 제거하고 접착 세포를 BMM 세포로 사용하였다.

### 4. 골 밀도 및 골격 형태 분석

경골 및 대퇴골은 WT 및 *Homer2*<sup>-/-</sup>, *Homer3*<sup>-/-</sup>, *Homer2/3* DKO 마우스에서 분리되었다. 골 밀도는 3D Mct (SkyScan-1076 high resolution *in vivo* μCT system; SkyScan, Aartselaar, Belgium)로 측정하고 CTAn 및 cone beam reconstruction software로 분석하였다. 조직학적 염색과 분석은 선행연구에서 사용된 방법과 동일하게 실시하였다[11,24].

### 5. Tartrate-resistant acid phosphatase 염색 분석(TRAP stain assay)

BMM 세포를  $3 \times 10^5$  세포/well의 밀도로 96-플레이트에 파종하고 지시된 화합물로 전처리하였다. 세포를 50 ng/mL sRANKL로 자극한 지 4일 후, 세포 분화 속도를 평가하기 위해 TRAP 염색 분석을 수행하였다. TRAP 염색은 선행연구에서 기술한 방법과 동일하게 실시하였

다[24]. 4% paraformaldehyde 용액으로 고정 후, 100  $\mu$ L의 TRAP 염색 용액을 첨가하고 40분 동안 염색하였다. TRAP-양성 단핵 세포 ( $\geq 3$ 핵 함유)를 계수하였다.

## 6. 골 흡수율 측정(Pit assay)

BMM 세포를 hydroxyapatite 미네랄로 코팅된 Osteo assay 플레이트(Corning)에 파종하여 6일 동안 BMM 세포를 30 ng/mL M-CSF 및 50 ng/mL sRANKL를 처리한 후 차아 염소산 나트륨 용액 (sodium hypochlorite solution)으로 1시간 동안 실온에서 세척하였다. 플레이트 표면에 형성된 피트는 이미지화하여 MetaMorph 소프트웨어(Molecular Devices, San Jose, CA, USA)를 사용하여 계산하였다.

## 7. 실험자료의 통계 분석

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

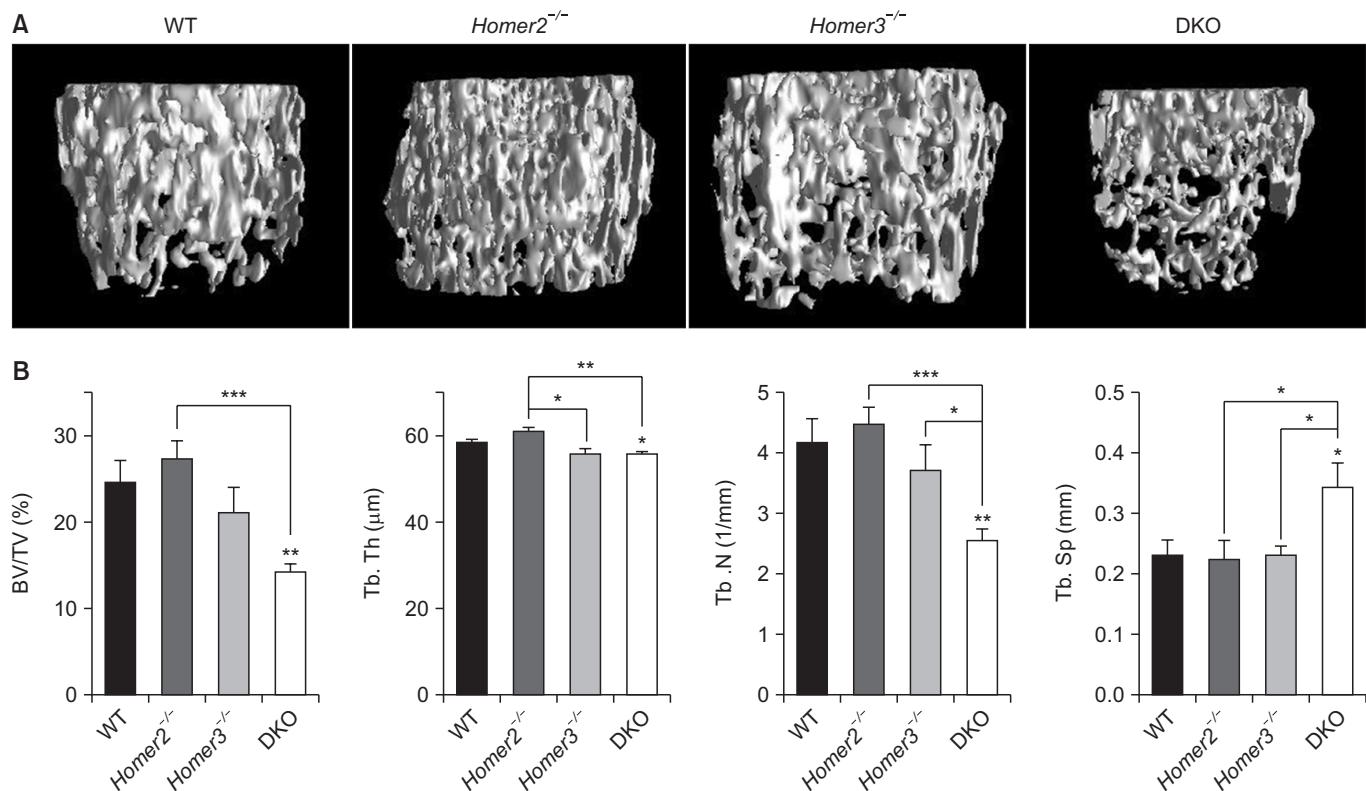
## Results

### 1. 대조군과 유전자 제거 마우스들에서 골 밀도 변화 비교

본 연구팀은 이전의 연구에서 *Homer2/3 DKO* 마우스의 골 밀도는 대조군에 비해 현저히 감소되었으나, 뼈 생성에는 영향을 주지 않음을 보고하였다[24]. *Homer* 단백들이 골 밀도에 미치는 영향을 조사하기 위해 4-6주령된 대조군과 *Homer2<sup>-/-</sup>*, *Homer3<sup>-/-</sup>*, *Homer2/3 DKO* 마우스의 경골 및 대퇴골을 분리하여 골 밀도를 측정하였다. *Homer2<sup>-/-</sup>*와 *Homer3<sup>-/-</sup>*에서의 골 밀도는 대조군과 차이가 나지 않았으나, 골 밀도가 감소된 *Homer2/3 DKO*와의 골량 및 지주골(trabecular bone)의 두께, 수, 그리고 지주골 간의 거리 모두 현저히 차이가 나는 것을 확인하였다(Fig. 1). 이러한 결과들은 *Homer* 단백 단독 발현 억제가 골 밀도에 영향을 미치기 어려움을 보여준다.

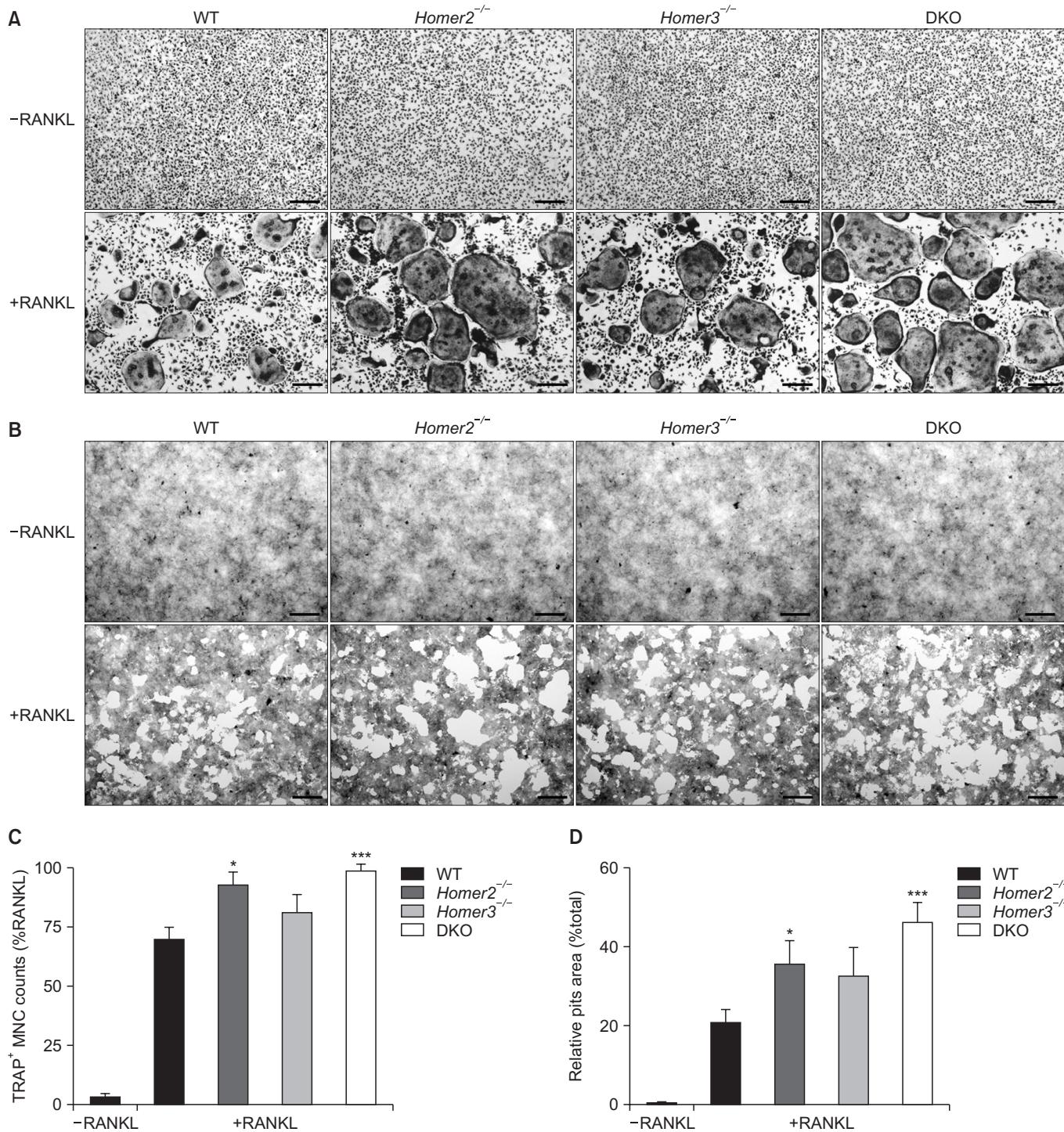
### 2. RANKL에 의한 파골세포 분화 활성 변화

본 연구팀은 이전의 연구에서 *Homer2/3 DKO* 발현과 파골세포 분화과정에서의 NFAT의 발현 및 분화 활성 조절 간의 상관성을 보고하였다



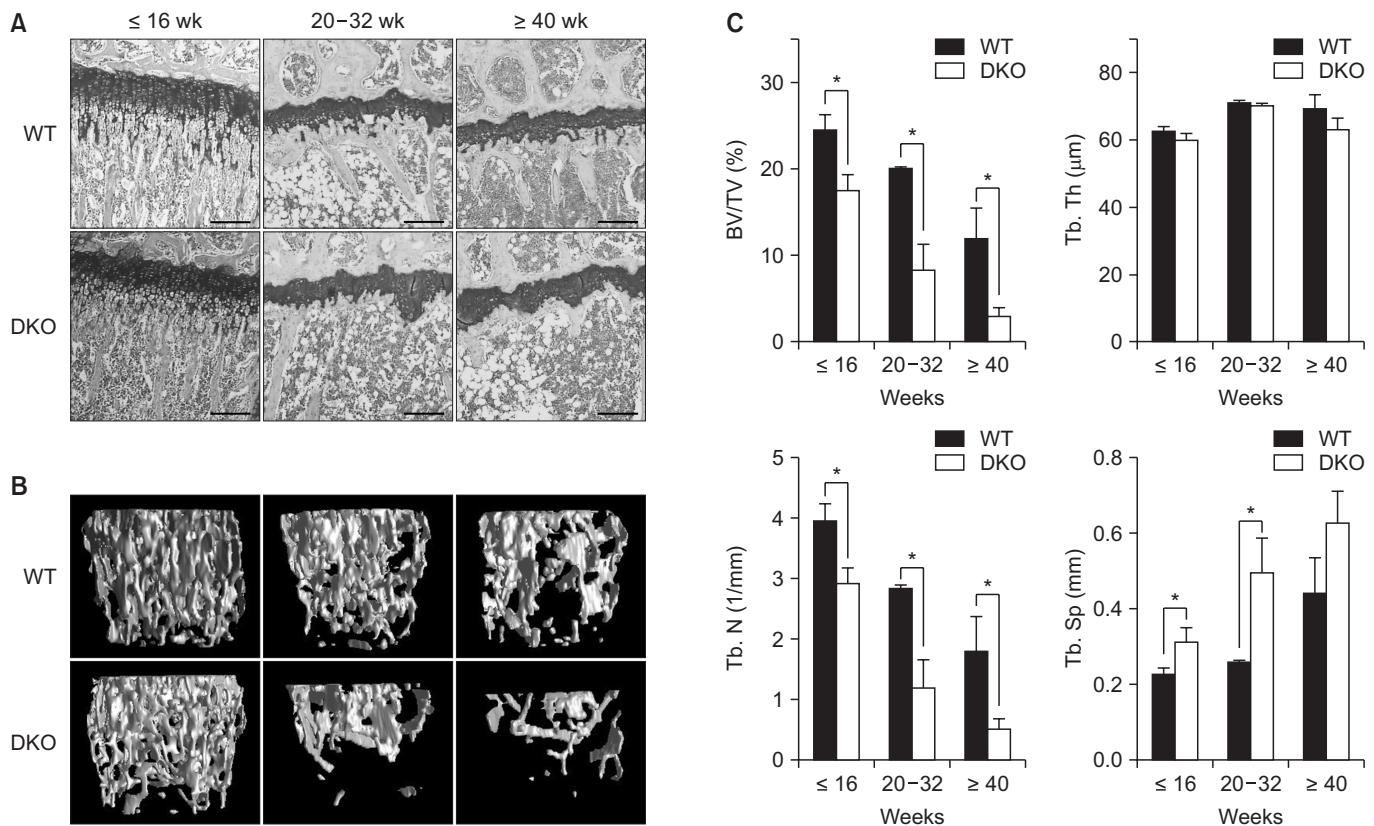
**Fig. 1.** Measurements of bone density in wild-type (WT), *Homer2<sup>-/-</sup>*, *Homer3<sup>-/-</sup>*, and *Homer2/3 DKO* mice. (A) Microradiographic analyses of femurs in WT ( $n = 10$ ), *Homer2<sup>-/-</sup>* ( $n = 7$ ), *Homer3<sup>-/-</sup>* ( $n = 9$ ) and *Homer2/3 DKO* ( $n = 8$ ) mice. Trabecular and cortical bone mass of *Homer2/3 DKO* decreased (4-6 weeks). (B) μCT data of proximal femur obtained from WT, *Homer2<sup>-/-</sup>*, *Homer3<sup>-/-</sup>*, and *Homer2/3 DKO* mice. Each parameter, including bone volume/total volume (BV/TV), trabecular thickness (Tb. Th), trabecular number (Tb. N), and trabecular spacing (Tb. Sp) were calculated and presented. Data were normalized to bone volume in WT mice and expressed as mean  $\pm$  standard error.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$  compared with WT and *Homer2/3 DKO*.



**Fig. 2.** Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL)-induced osteoclastogenesis changes in *Homer2*<sup>-/-</sup> and *Homer2/3* DKO BMMs. (A) RANKL-induced osteoclast differentiation *in vitro* in wild-type (WT), *Homer2*<sup>-/-</sup>, *Homer3*<sup>-/-</sup> and *Homer2/3* DKO BMMs by tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining (scale bar, 50  $\mu$ m). (B) Measurements of the bone resorption activity in WT (n = 3), *Homer2*<sup>-/-</sup> (n = 3), *Homer3*<sup>-/-</sup> (n = 3) and *Homer2/3* DKO (n = 3) mice (Pit assay; scale bar, 50  $\mu$ m). (C) Columns show quantitative analysis of the number of TRAP positive (TRAP<sup>+</sup>) multinucleated cells (MNCs;  $\geq 3$  nuclei) in WT (n = 3), *Homer2*<sup>-/-</sup> (n = 3), *Homer3*<sup>-/-</sup> (n = 4) and *Homer2/3* DKO (n = 4) mice. The number of TRAP<sup>+</sup> MNCs are significantly higher in *Homer2*<sup>-/-</sup> and *Homer2/3* DKO mice. We normalized the data to the number of MNCs in RANKL-treated bone marrow-derived monocytes/macrophage (BMMs) of WT mice. (D) Bone resorption activities during osteoclastogenesis are higher in *Homer2*<sup>-/-</sup> and *Homer2/3* DKO BMMs cells. Data were normalized to the total pits in osteoclasts of WT mice. Results were expressed as the mean  $\pm$  standard error.

\*p < 0.05 and \*\*\*p < 0.001 compared with RANKL-treated WT.



**Fig. 3.** Decreased bone density of *Homer2/3* DKO mice in aging-dependent manner. (A) Histology (hematoxylin and eosin staining) of tibias from  $\leq 16$ , 20–32, and  $\geq 40$  weeks of wild-type (WT) and *Homer2/3* DKO mice (scale bar, 100  $\mu$ m). The bone density was reduced in bone marrow of *Homer2/3* DKO mice because of resorbed bone. (B, C) Microradiographic analyses of femur in  $\leq 16$ , 20–32, and  $\geq 40$  weeks of WT ( $n = 15$ ;  $n = 4$ ;  $n = 4$ ) and *Homer2/3* DKO ( $n = 14$ ;  $n = 4$ ;  $n = 7$ ) mice. *Homer2/3* DKO mice reduced bone density compared to WT in an aging-dependent manner. Data were normalized to bone volume in WT mice and expressed as mean  $\pm$  standard error.

BV/TV, bone volume/total volume; Tb. Th, trabecular thickness; Tb. N, trabecular number; Tb. Sp, trabecular spacing.

\* $p < 0.05$  compared with WT.

[24]. Homer 단백들이 파골세포 분화에 미치는 영향을 조사하기 위해 대조군과 *Homer2*<sup>−/−</sup>, *Homer3*<sup>−/−</sup>, *Homer2/3* DKO 마우스의 BMM 세포에 RANKL 처리 4일 후 TRAP-양성 다핵 세포를 확인하였다. RANKL 자극에 의해 다핵으로 분화된 성숙된 파골세포의 수를 비교한 결과, *Homer2*<sup>−/−</sup>와 *Homer2/3* DKO의 성숙된 파골세포가 대조군보다 현저히 증가된 것을 확인하였다(Fig. 2A and 2C). 또한, BMM 세포에 RANKL 처리 6일 후 골 흡수율을 측정한 결과, *Homer2*<sup>−/−</sup>와 *Homer2/3* DKO의 성숙된 파골세포의 골 흡수율도 대조군에 비해 현저히 증가된 것을 확인하였다(Fig. 2B and 2D). 이는 Homer 단백 발현이 파골세포 분화 활성 조절에 관여함을 시사한다.

### 3. *Homer2/3* DKO 마우스에서 노화에 따른 골 밀도 변화

노화에 따른 *Homer2*와 *Homer3* 단백 발현 억제가 골 밀도에 미치는 영향을 조사하기 위해 16주령 이하, 20–32주령, 40주령 이상된 대조군과 *Homer2/3* DKO 마우스의 경골 및 대퇴골을 분리하여 골 밀도를 측정하였다. Hematoxylin and eosin 조직 염색과 분석을 통

해 *Homer2/3* DKO 마우스에서의 골량 및 지주골 간의 거리가 노화가 진행됨에 따라 대조군과 차이가 나는 것을 확인하였다(Fig. 3A). 또한,  $\mu$ CT 분석을 통해 *Homer2/3* DKO 마우스에서 골량 및 지주골의 수, 그리고 지주골 간의 거리가 노화가 진행됨에 따라 현저히 감소되는 것을 확인하였다(Fig. 3B and 3C). 이러한 결과들은 *Homer2*와 *Homer3* 단백이 골 밀도 조절 및 노화에 따른 골 밀도의 변화와 밀접한 관계가 있음을 시사한다.

## Discussion

본 연구는 노화과정에서의 파골세포 분화 및 뼈 대사 조절에 대한 *Homer2*와 *Homer3* 단백의 역할을 새롭게 규명하였다. *Homer2*와 *Homer3* 단백의 동시 발현 억제를 통해 파골세포 분화과정에서 성숙한 파골세포의 활성능력을 증진시킬 뿐만 아니라 노화에 따른 골 밀도 감소가 촉진된다는 것을 확인하였다. 이는 본 연구진의 이전 보고에서 *Homer2*와 *Homer3* 단백이 RANKL에 의한 NFATc1 활성화를 조절하여 RANKL 매개 파골세포 분화의 주요 조절자임[24]을 재확인한 것

과 동시에 Homer 단백의 이러한 작용이 노화에 따른 뼈의 항상성 변화와도 밀접한 관련이 있음을 제시한 것이다.

이전의 연구들에서 Homer 단백은 여러 칼슘 신호 전달 단백들과 상호작용을 하며[30,32,33], 이들 칼슘 신호 전달 단백들은 파골세포 형성에 중요한 역할을 담당하는 칼슘의 주기적 진동 반응의 생성 후 순차적으로 파골세포 분화를 조절한다고 알려져 있다[4,11,13,14]. 칼시뉴린/NFAT 신호 전달기전을 조절할 경우, 조골세포의 생성과 파골세포 분화 및 작용에 의한 뼈 리모델링에 결정적 영향을 줄 수 있다 [2,15,22,23,35]. 최근 소뇌의 퍼킨제 세포에서 mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1)이 Homer3 단백 발현을 직접 조절하며[36], mTORC1이 칼시뉴린/NFATc1에 의한 파골세포 분화를 방해한다[37]고 보고되었다. 또한, 여러 연구들을 통해 NFAT은 골격근 분화 및 T 세포 활성화에 관여하는 Homer 단백과 결합하여 작용한다고 알려져 있다[26,34,38]. 본 연구진도 Homer2와 Homer3 단백이 조골세포 분화와는 상관없이 파골세포 형성 과정에 중요한 역할을 담당 하지만, 칼슘의 진동 반응과는 독립적으로 작용하며, 칼시뉴린과 경쟁적으로 NFAT의 발현을 조절하여 성숙된 파골세포 형성 및 작용에 관여함을 보고하였다[24].

노화가 진행됨에 따라 폐경에 의한 성호르몬의 결핍이나 골량이 최고 조에 도달한 이후 파골세포에 의한 뼈의 재흡수와 조골세포에 의한 뼈 생성을 통한 뼈의 리모델링 주기가 점차 느려져 결국 골량이 감소된다. 이러한 골 소실에 대한 치료는 성호르몬 조절이나 운동에 의한 기계적 자극, bisphosphonate나 부갑상샘호르몬과 같은 조골세포에 의한 뼈 생성 촉진제, 또는 denosumab과 같은 파골세포 분화기전에서의 작용 억제제 등을 사용하고 있지만, 효과가 미비하거나 동반되는 부작용으로 인하여 치료가 한정적이다[39]. 최근, 가벼운 기계적 자극과 함께 칼시뉴린 억제제인 cyclosporine A를 처리하였을 때 뼈 생성률이 노화가 일

어나지 않은 경우와 비슷하게 증가하여 노화에 의한 골 소실이 줄었다는 보고가 있었다[40]. 그러나, 노화에 의한 골 소실과 관련된 기전 연구뿐만 아니라 치료에 대한 연구는 여전히 부족한 실정이다. Homer2와 Homer3 단백의 후기 파골세포 분화 조절 작용은 두 Homer 단백의 동시 발현 조절에 의해서만 가능하며, 노화에 따른 뼈 대사의 균형 조절에 관여함을 직접적으로 보여준 연구 결과는 없었다. 이전의 보고들과 함께 본 연구의 결과들을 통하여 파골세포에서 Homer2와 Homer3 단백이 NFATc1 활성, 다향의 성숙한 파골세포 형성 및 작용 활성이라 는 순차적 신호기전을 조절함과 동시에 노화 자극에 따른 뼈의 리모델링 과정에도 그대로 작용할 수 있다고 여겨진다[24,37,40]. 본 논문은 Homer2와 Homer3 단백이 파골세포의 NFAT 신호 전달기전에 작용하여 파골세포의 분화 및 작용을 직접 조절함과 동시에 정상 상태뿐만 아니라 노화에 따른 뼈의 리모델링에도 관여한다는 것을 명확히 보여 주고 있으며, 골다공증과 같은 골격계 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

1. Lerner UH. Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis. *J Dent Res* 2006;85:584–95. doi: 10.1177/154405910608500703.
2. Takayanagi H. The role of NFAT in osteoclast formation. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1116:227–37. doi: 10.1196/annals.1402.071.
3. Zaidi M. Skeletal remodeling in health and disease. *Nat Med* 2007;13:791–801. doi: 10.1038/nm1593.
4. Takayanagi H, Kim S, Koga T, Nishina H, Isshiki M, Yoshida H, Saiura A, Isobe M, Yokochi T, Inoue J, Wagner EF, Mak TW, Kodama T, Taniguchi T. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell* 2002;3:889–901. doi: 10.1016/s1534-5807(02)00369-6.
5. Luo X, Popov S, Bera AK, Wilkie TM, Muallem S. RGS proteins provide biochemical control of agonist-evoked  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations. *Mol Cell* 2001;7:651–60. doi: 10.1016/s1097-2765(01)00211-8.
6. Keinan D, Yang S, Cohen RE, Yuan X, Liu T, Li YP. Role of regulator of G protein signaling proteins in bone. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2014;19:634–48. doi: 10.2741/4232.
7. Bodnar D, Chung WY, Yang D, Hong JH, Jha A, Muallem S. STIM–TRP Pathways and microdomain organization:  $Ca^{2+}$  influx channels: the Orai–STIM1–TRPC complexes. *Adv Exp Med Biol* 2017;993:139–57. doi: 10.1007/978-3-319-57732-6\_8.
8. Kiselyov K, Wang X, Shin DM, Zang W, Muallem S. Calcium signaling complexes in microdomains of polarized secretory cells. *Cell Calcium* 2006;40:451–9. doi: 10.1016/j.ceca.2006.08.009.
9. Park B, Yang YM, Choi BJ, Kim MS, Shin DM. Activation of G proteins by aluminum fluoride enhances RANKL-mediated osteoclastogenesis. *Korean J Physiol Pharmacol* 2013;17:131–136.

427–33. doi: 10.4196/kjpp.2013.17.5.427.

10. Son A, Kim MS, Jo H, Byun HM, Shin DM. Effects of inositol 1,4,5-triphosphate on osteoclast differentiation in RANKL-induced osteoclastogenesis. *Korean J Physiol Pharmacol* 2012; 16:31–6. doi: 10.4196/kjpp.2012.16.1.31.
11. Kim MS, Yang YM, Son A, Tian YS, Lee SI, Kang SW, Muallem S, Shin DM. RANKL-mediated reactive oxygen species pathway that induces long lasting  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations essential for osteoclastogenesis. *J Biol Chem* 2010;285:6913–21. doi: 10.1074/jbc.M109.051557.
12. Ong EC, Nesin V, Long CL, Bai CX, Guz JL, Ivanov IP, Abramowitz J, Birnbaumer L, Humphrey MB, Tsikas L. A TRPC1 protein-dependent pathway regulates osteoclast formation and function. *J Biol Chem* 2013;288:22219–32. doi: 10.1074/jbc.M113.459826.
13. Yang YM, Kim MS, Son A, Hong JH, Kim KH, Seo JT, Lee SI, Shin DM. Alteration of RANKL-induced osteoclastogenesis in primary cultured osteoclasts from SERCA2+/- mice. *J Bone Miner Res* 2009;24:1763–9. doi: 10.1359/jbmr.090420.
14. Kim HJ, Prasad V, Hyung SW, Lee ZH, Lee SW, Bhargava A, Pearce D, Lee Y, Kim HH. Plasma membrane calcium ATPase regulates bone mass by fine-tuning osteoclast differentiation and survival. *J Cell Biol* 2012;199:1145–58. doi: 10.1083/jcb.201204067.
15. Hirotani H, Tuohy NA, Woo JT, Stern PH, Clipstone NA. The calcineurin/nuclear factor of activated T cells signaling pathway regulates osteoclastogenesis in RAW264.7 cells. *J Biol Chem* 2004;279:13984–92. doi: 10.1074/jbc.M213067200.
16. Takayanagi H. Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. *J Mol Med (Berl)* 2005;83:170–9. doi: 10.1007/s00109-004-0612-6.
17. Bootman MD, Lipp P, Berridge MJ. The organisation and functions of local  $\text{Ca}^{2+}$  signals. *J Cell Sci* 2001;114(Pt 12): 2213–22.
18. 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.
19. Crabtree GR, Olson EN. NFAT signalling: choreographing the social lives of cells. *Cell* 2002;109 Suppl:S67–79. doi: 10.1016/s0092-8674(02)00699-2.
20. Oh-hora M, Rao A. The calcium/NFAT pathway: role in development and function of regulatory T cells. *Microbes Infect* 2009;11:612–9. doi: 10.1016/j.micinf.2009.04.008.
21. Mognol GP, Carneiro FR, Robbs BK, Faget DV, Viola JP. Cell cycle and apoptosis regulation by NFAT transcription factors: new roles for an old player. *Cell Death Dis* 2016;7:e2199. doi: 10.1038/cddis.2016.97.
22. Sun L, Blair HC, Peng Y, Zaidi N, Adebanjo OA, Wu XB, Wu XY, Iqbal J, Epstein S, Abe E, Moonga BS, Zaidi M. Calcineurin regulates bone formation by the osteoblast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:17130–5. doi: 10.1073/pnas.0508480102.
23. Winslow MM, Pan M, Starbuck M, Gallo EM, Deng L, Karsenty G, Crabtree GR. Calcineurin/NFAT signalling in osteoblasts regulates bone mass. *Dev Cell* 2006;10:771–82. doi: 10.1016/j.devcel.2006.04.006.
24. Son A, Kang N, Oh SY, Kim KW, Muallem S, Yang YM, Shin DM. Homer2 and Homer3 modulate RANKL-induced NFATc1 signalling in osteoclastogenesis and bone metabolism. *J Endocrinol* 2019;242:241–9. doi: 10.1530/JOE-19-0123.
25. Shanmugarajan S, Haycraft CJ, Reddy SV, Ries WL. NIP45 negatively regulates RANK ligand induced osteoclast differentiation. *J Cell Biochem* 2012;113:1274–81. doi: 10.1002/jcb.23460.
26. 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.
27. GuezGuez A, Prod'homme V, Mouska X, Baudot A, Blin-Wakkach C, Rottapel R, Deckert M. 3BP2 adapter protein is required for receptor activator of NF $\kappa$ B ligand (RANKL)-induced osteoclast differentiation of RAW264.7 cells. *J Biol Chem* 2010;285:20952–63. doi: 10.1074/jbc.M109.091124.
28. Foucault I, Le Bras S, Charvet C, Moon C, Altman A, Deckert M. The adaptor protein 3BP2 associates with VAV guanine nucleotide exchange factors to regulate NFAT activation by the B-cell antigen receptor. *Blood* 2005;105:1106–13. doi: 10.1182/blood-2003-08-2965.
29. 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.
30. Worley PF, Zeng W, Huang G, Kim JY, Shin DM, Kim MS, Yuan JP, Kiselyov K, Muallem S. Homer proteins in  $\text{Ca}^{2+}$  signalling by excitable and non-excitable cells. *Cell Calcium* 2007; 42:363–71. doi: 10.1016/j.ceca.2007.05.007.
31. Yuan JP, Kiselyov K, Shin DM, Chen J, Shcheynikov N, Kang SH, Dehoff MH, Schwarz MK, Seburg 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.

32. 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.

33. Yang YM, Lee J, Jo H, Park S, Chang I, Muallem S, Shin DM. Homer2 protein regulates plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in mouse parotid gland acinar cells. *J Biol Chem* 2014;289:24971–9. doi: 10.1074/jbc.M114.577221.

34. 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.

35. Kim JH, Kim K, Kim I, Seong S, Jeong BC, Nam KI, Kim KK, Molkentin JD, Kim N. RCANs regulate the convergent roles of NFATc1 in bone homeostasis. *Sci Rep* 2016;6:38526. doi: 10.1038/srep38526.

36. Ruegsegger C, Stucki DM, Steiner S, Angliker N, Radecke J, Keller E, Zuber B, Rüegg MA, Saxena S. Impaired mTORC1-dependent expression of homer-3 influences SCA1 pathophysiology. *Neuron* 2016;89:129–46. doi: 10.1016/j.neuron.2015.11.033.

37. Huynh H, Wan Y. mTORC1 impedes osteoclast differentiation via calcineurin and NFATc1. *Commun Biol* 2018;1:29. doi: 10.1038/s42003-018-0028-4.

38. Salanova M, Bortoloso E, Schiffli G, Gutsmann M, Belavy DL, Felsenberg D, Furlan S, Volpe P, Blottner D. Expression and regulation of Homer in human skeletal muscle during neuromuscular junction adaptation to disuse and exercise. *FASEB J* 2011;25:4312–25. doi: 10.1096/fj.11-186049.

39. Demontiero O, Vidal C, Duque G. Aging and bone loss: new insights for the clinician. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 2012;4: 61–76. doi: 10.1177/1759720X11430858.

40. Srinivasan S, Ausk BJ, Prasad J, Threet D, Bain SD, Richardson TS, Gross TS. Rescuing loading induced bone formation at senescence. *PLoS Comput Biol* 2010;6:e1000924. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000924.