

GRP94的结构、生理功能及与疾病的关系

叶佳纯, 王 英*

(宁波大学附属李惠利医院, 宁波 315040)

摘要: 葡萄糖调节蛋白94(glucose-regulated protein 94, GRP94)是分子伴侣热激蛋白90(heat shock protein 90, Hsp90)的内质网亚型。生理条件下, 它在调节生物生理功能方面起着协助膜蛋白折叠、维持钙稳态以及调节免疫系统功能的重要作用。在病理条件下, 过表达GRP94将影响某些疾病如肿瘤及病毒性感染的发生发展过程, 因此识别参与疾病的GRP94客户蛋白以及开发GRP94小分子靶向抑制剂对相关疾病的治疗具有积极意义。本文就GRP94的结构、功能及其在相关疾病中发挥的作用的研究进展展开综述。

关键词: 病毒性疾病; GRP94; 分子伴侣; 肿瘤

Structure, physiological function, and relationship of GRP94 to disease

YE Jiachun, WANG Ying*

(The Affiliated Lihuli Hospital, Ningbo University, Ningbo 315040, China)

Abstract: Glucose-regulated protein 94 (GRP94) is an endoplasmic reticulum isoform of the molecular chaperone heat shock protein 90 (Hsp90). Under physiological conditions, it plays an important role in regulating biological physiological functions by assisting membrane protein folding, maintaining calcium homeostasis, and regulating the function of the immune system. Under pathological conditions, overexpression of GRP94 will affect the development of certain diseases such as tumors and viral infections, therefore the identification of GRP94 client proteins involved in diseases and developing specific small-molecule inhibitors of GRP94 are of positive significance for the treatment of related diseases. This paper reviews the structure, function, and role of GRP94 in related diseases.

Key Words: viral diseases; GRP94; chaperone; cancer

蛋白质的动态平衡对健康至关重要, 毒性应激诱发蛋白质错误折叠和聚集, 从而触发蛋白质质量控制系统。分子伴侣通过蛋白质重折叠、蛋白酶体降解错误折叠蛋白及自噬等主要机制调控蛋白质稳态, 任一过程失调均可能导致严重的蛋白毒性, 进一步引起神经退行性或遗传性疾病, 如亨廷顿舞蹈病、帕金森病、淀粉样变性、阿尔茨海默症和遗传性长QT综合征^[1,2]。在真核生物

中, 分子伴侣热激蛋白90(heat shock protein 90, Hsp90)对维持细胞稳态起着至关重要的作用, 这些作用包括核染色体重构, 细胞生长、分化及繁殖, 细胞转导, 细胞转运等^[3,4]。Hsp90依赖ATP循环作用于特定的蛋白质, 确保客户蛋白的折叠、运输和组装, 最终形成多蛋白复合体^[5]。

Hsp90有4种同源表达物——胞质Hsp90、叶绿体Hsp90C、肿瘤坏死因子受体相关蛋白1(tumor

收稿日期: 2022-07-06

基金项目: 宁波市自然科学基金项目(2019A610343)

第一作者: E-mail: lovemay2022@163.com

*通信作者: E-mail: lovelymaomao81@163.com

necrosis factor receptor-associated protein 1, TRAP1)、GRP94, 分别存在于胞质、叶绿体、线粒体和内质网中^[6]。研究认为, 在真核生物进化的早期, GRP94可能通过基因复制产生, 而复制形式的GRP94通过突变获得叶绿体前导序列后产生Hsp90C, TRAP1的起源尚不清楚^[7]。本文主要讨论Hsp90内质网亚型GRP94的结构、分子特征、生理状态下的功能以及在相关疾病中的作用机制研究进展。

1 GRP94的结构

GRP94是内质网中主要的钙结合蛋白, 也是最丰富的内质网驻留蛋白^[8]。在生理条件下, 用X射线结晶学、电子显微镜和小角X射线散射等方法确定了GRP94是一个扭曲的V形二聚体结构^[9]。包括GRP94在内的Hsp90同源物的分子结构包括三个高度保守结构域: 氨基末端结构域(amino-terminal domain, NTD)、中间结构域(the middle domain, MD)和羧基末端结构域(the carboxy-terminal domain, CTD)^[10](图1A)。NTD介导与ATP的结合, 故也称核苷酸结合部位(图1B), 此区的ATP结合位点为 GRP94 ATP酶活性所必需的, 也是

GRP94抑制剂如格尔达霉素和自由基的主要靶点^[11]。GRP94与Hsp90的N端氨基酸在长度和序列上都不同, 表明两者在ATP结合和NTD二聚化过程中经历不同的构象变化。MD包含一个催化ATP水解的环, 与NTD相互作用进行ATP水解, 并且对GRP94与客户蛋白的结合起重要作用^[12]。CTD主要负责GRP94的二聚化并形成功能性酶, 此结构域包含GRP94客户蛋白结合位点^[13]。Hsp90的C末端有一个保守的四肽重复序列, 它协助与辅助伴侣的相互作用, 而GRP94的末端是内质网驻留信号序列, 该四肽序列对于GRP94在内质网管腔中的存留至关重要^[14]。在真核生物中, GRP94的带电连接区域(amino acid residues 286-341, CR)为NTD与MD之间的短动态区域, 它和MD共同控制ATPase活性^[15]。此外, CR还包含细胞内钙稳态所需的钙结合部位, 钙能诱导NTD的构象变化, 并增强GRP94与多肽之间的相互作用, 这是GRP94的一个独特功能^[15,16]。

2 GRP94的生理作用

GRP94被定义为在内质网中因葡萄糖饥饿而大幅度上调的细胞蛋白。在细胞的正常生理状态

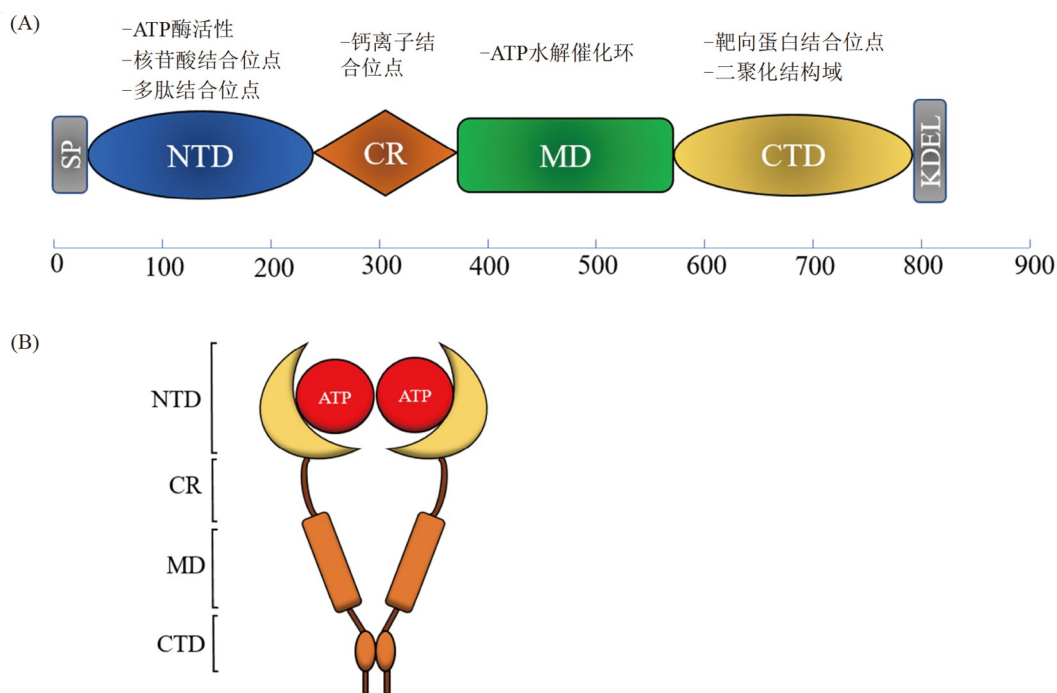


图1 GRP94结构示意图

下, GRP94可在氧化应激、内质网钙耗竭、错误折叠蛋白积聚等各种扰乱内质网功能的应激条件下特异性上调^[10]。至今为止, 已有GRP94作为伴侣蛋白发挥功能的许多途径, 如通过参与膜和分泌蛋白的折叠和组装介导许多免疫反应; 调节内质网的钙缓冲; 靶向错误折叠蛋白质进行内质网相关途径的降解(endoplasmic reticulum-associated degradation, ERAD)等^[17,18], 以下进行简要的阐述(图2)。

2.1 GRP94协助蛋白质折叠

GRP94作为分子伴侣的主要任务是促进蛋白质折叠和组装, 通过此作用参与调节各种功能, 包括免疫作用、细胞生长和黏附。相较于其他内质网分子伴侣, GRP94的一个重要特征是它的功能选择性。这一特征表现为与特定的客户蛋白相结合, 如免疫球蛋白重链或轻链和Toll样受体(toll-like receptors, TLRs)。Yang等^[19]发现, 缺乏GRP94的巨噬细胞不能对质膜TLRs的配体产生反应, 表明GRP94在调节TLRs反应和宿主对细菌感染防御方面的重要性。在缺乏GRP94的哺乳动物细胞膜上, GRP94的果蝇同源物gp93也可以协助表达

TLRs^[20]。除以上的免疫客户蛋白之外, GPR94还与胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)、整合素、血小板糖蛋白Ib-IX-V复合体等客户蛋白结合。Staron等^[21]发现, GRP94与Willebrand因子的受体血小板膜糖蛋白Ib-IX-V复合体相互作用, 保证在凝血过程中对血小板的激活作用, 随之血小板发挥黏附作用促进止血; 在小鼠肝脏敲除特异的GRP94基因后, 由于整合素 $\beta 1$ 的缺失, 肝祖细胞的细胞黏附中中断, 该研究证实GRP94和整合素之间的相互作用参与了调节细胞黏附作用^[22]。因此, 各种客户蛋白的高效转运、细胞膜表达与发挥增殖、黏附、免疫作用均离不开内质网分子伴侣GRP94的协助。

2.2 GRP94维持钙稳态

内质网中的钙结合蛋白提供了巨大的钙存储容量, 使高浓度的游离或者结合钙离子积聚在内质网中, 钙离子的浓度可随各种细胞应激而上下调节以激活相应的细胞信号通路或生理反应。GRP94作为内质网管腔中主要的钙结合蛋白之一, 在相关研究中被证实其N末端在其带电连接区域中至少含有一个高亲和力的钙结合位点^[23]。此外,

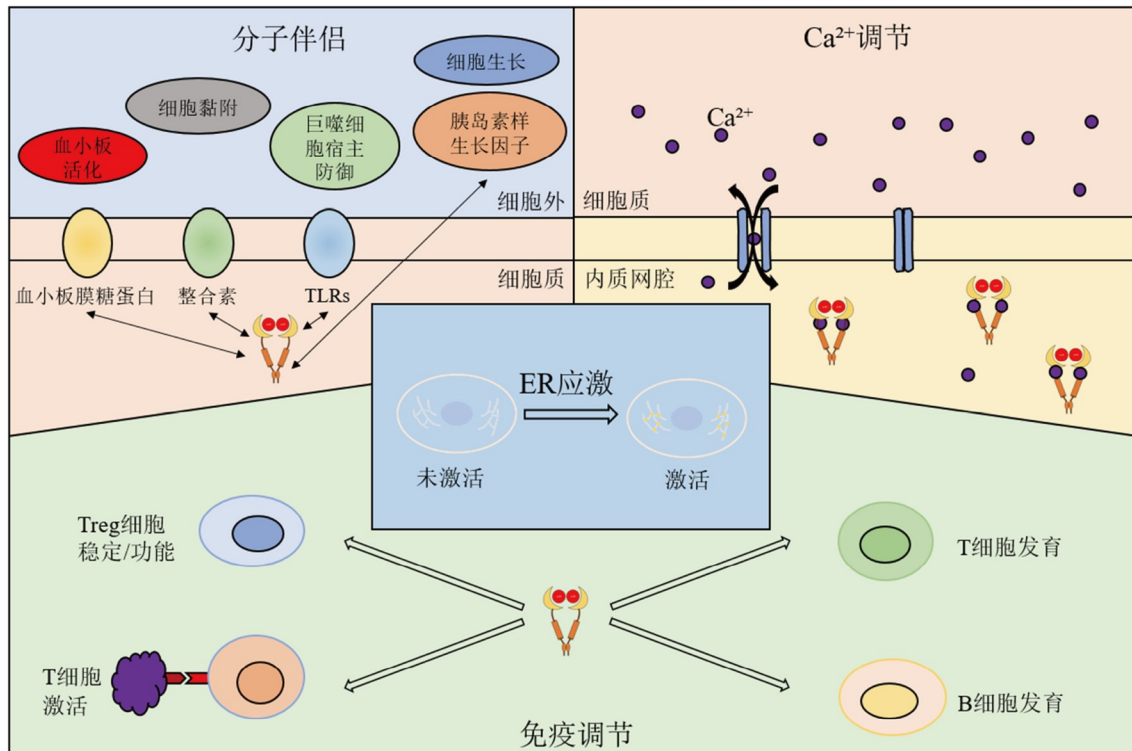


图2 GRP94的生理作用示意图

有研究还发现,敲除*GRP94*基因后的胚胎干细胞在钙离子耗竭的介质中停止生长^[22]。Vitadello等^[24]通过暴露于钙离子载体A23187的肌肉细胞系中过表达*GRP94*,发现细胞内钙的增加明显慢于对照细胞。以上结果均表明,*GRP94*在调节细胞内钙稳态方面发挥着关键作用。

2.3 *GRP94*协助ERAD

*GRP94*是内质网质量控制系统的检查点,其作用可以概括为:伴侣蛋白的折叠介质;与内质网蛋白折叠机制的其他成分相互作用;协助错误折叠的蛋白靶向ERAD^[25]。此外,*GRP94*还参与内质网应激过程(endoplasmic reticulum stress, ERS)。由于蛋白质转运障碍与毒性应激触发内质网滞留信号,引起ERS,从而导致未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR),若UPR持续不缓解,最终将造成细胞凋亡^[8]。在此过程中,*GRP94*通过增强胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factors-1, IGF-1)和胰岛素样生长因子-2(insulin-like growth factors-2, IGF-2)的折叠和表达,导致激素浓度提升,并促进IGF通路,最终达到改善UPR、增加内质网的折叠能力、抑制细胞凋亡和缓解代谢压力的目的^[8,26]。

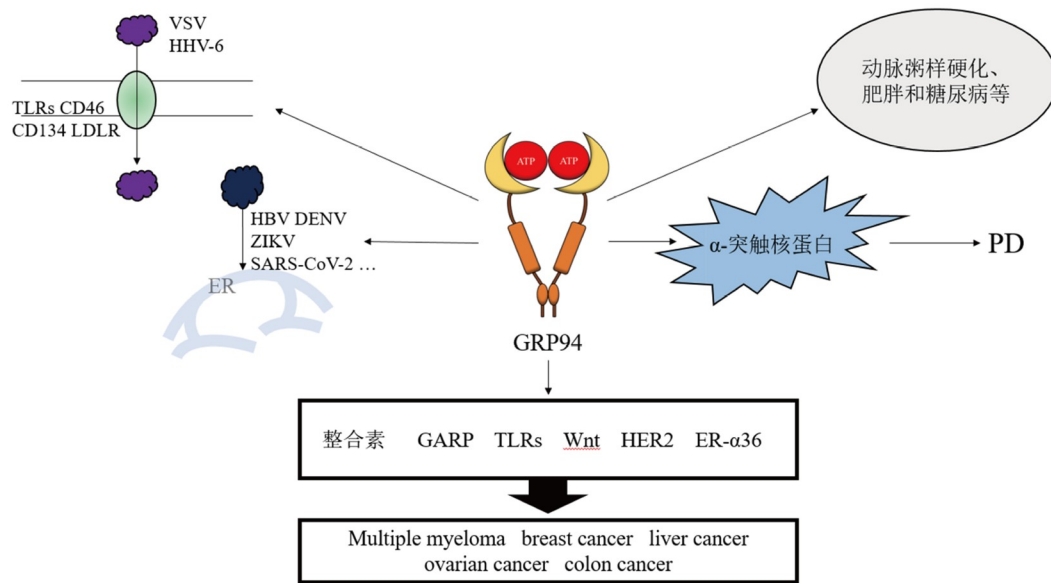
2.4 *GRP94*的免疫调节作用

除了伴侣功能外,*GRP94*在调节免疫系统方面也发挥着重要作用。Staron等^[27]报道称,在敲除小鼠*GRP94*基因后,阻断了其T淋巴细胞和B淋巴细胞的生成,表明它在T细胞和B细胞的发育过程中发挥重要作用。还有更多的研究直接证明了*GRP94*参与抗原提呈过程,并诱导抗原提呈细胞(antigen-presenting cell, APC)的成熟与激活,以促进T细胞激活^[28,29]。此外,Zhang等^[30]研究发现,在敲除*GRP94*基因的小鼠中,因为缺乏*GRP94*造成调节性T细胞(regulatory T cell, Treg)不稳定及功能损害,促进炎症性疾病发生,表明*GRP94*是Treg维持稳定和功能必需的。另外,虽然*GRP94*主要定位于内质网,但在肿瘤细胞表面也有表达,相关研究已证实,在非病理条件下*GRP94*也可释放至胞外发挥免疫原性,这可能是其成为肿瘤标志物的理论依据^[31]。

3 *GRP94*在疾病中的作用

3.1 病毒性疾病

TLRs的成分为核酸和包膜糖蛋白,可以作为病毒天然免疫的关键传感器发挥作用^[32]。如前所述,*GRP94*可促进TLRs的输出与表达。在病毒感染后,TLRs被激活并且随之触发相应的信号通路,产生I型干扰素、炎症细胞因子和趋化因子,消除入侵的病原体^[33]。除了上述发现,*GRP94*也被证实在水疱性口炎病毒(vesicular stomatitis virus, VSV)与人类疱疹病毒-6(human herpes virus-6, HHV-6)的感染过程中必不可少^[34]。VSV引起的家畜水疱性口炎对人类的影响十分轻微,但近来它作为癌症治疗的溶瘤剂展示了巨大的生物医学潜力。Nikolic等^[35]证实,VSV作为携带包膜蛋白G的病毒进入细胞需要*GRP94*携带一种来自低密度脂蛋白受体家族的细胞蛋白并且发挥*GRP94*在分子伴侣循环中的ATPase活性作用,该受体家族是VSV的细胞受体。以上过程阐明了*GRP94*在VSV进入细胞过程中发挥的相关作用。HHV-6是β疱疹病毒亚科的一种疱疹病毒,HHV-6A和HHV-6B在T细胞上的细胞受体分别是CD46和CD134。Prusty等^[36]发现,*GRP94*与HHV-6A病毒粒子相互作用,并在人T细胞白血病细胞株感染过程中促进HHV-6A与靶细胞的附着。同时,他们还发现,HHV-6A感染可促进细胞表面*GRP94*的表达,HHV-6A病毒粒子与HHV-6B的病毒糖蛋白分别与*GRP94*相互作用,而*GRP94*的缺失、可溶性*GRP94*竞争或阻断其抗体可抑制HHV-6的感染^[34],在感染后5 min内*GRP94*的细胞表面表达就开始了,但*GRP94*如何与CD46或CD134一起发挥作用目前尚不明确^[34](图3)。此外,*GRP94*还可以在病毒进入过程的早期通过调节参与病毒包膜糖蛋白裂解的细胞蛋白质来发挥作用。病毒与宿主细胞受体或辅助受体结合通常是确立感染的第一步,蛋白质水解激活是病毒与宿主细胞结合的关键步骤^[37]。对于近年来新出现的冠状病毒来说,它包膜上的刺突糖蛋白由蛋白酶激活,人冠状病毒HKU1(human coronavirus HKU1, HCoV-HKU1)、中东呼吸综合征冠状病毒(Middle East respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV)和严重急性呼吸综合征冠状病毒-2



VSV: 水疱性口炎病毒; HHV-6: 人类疱疹病毒6; TLRs: Toll样受体; CD134: OX-40配体 I 型表面糖蛋白; LDLR: 低密度脂蛋白受体家族; HBV: 乙肝病毒; DENV: 登革病毒; ZIKV: 寨卡病毒; SARS-CoV-2: 严重急性呼吸综合征冠状病毒-2; GARP: 糖蛋白A为主重复序列蛋白; Wnt: Wnt信号通路; HER2: 人表皮生长因子受体2; ER-α36: 雌激素受体(ER)-α36; PD: 帕金森病

图3 GRP94与疾病的关系

(severe acute respiratory symptom coronavirus-2, SARS-CoV-2)等冠状病毒的包膜刺突糖蛋白S, 均含有一个可被弗林蛋白酶切割的位点, 靶向此位点的弗林蛋白酶可催化切割原蛋白中的羧基端肽键以产生成熟的蛋白质, 此酶切割SARS-CoV-2包膜刺突糖蛋白的S₁/S₂位点是病毒进入人肺细胞的关键步骤^[38-41]。有研究表明, GRP94与人胚肾细胞中的弗林蛋白酶相互作用并对其进行调节, 以小干扰RNA的方式降低GRP94的表达后, 可抑制弗林蛋白酶在细胞内的运输及血小板反应蛋白解整合素金属肽酶9酶原在细胞膜上的蛋白水解活性^[42]。有研究发现, GRP94也可与组织蛋白酶直接相互作用^[43]。以上表明, GRP94的活性可能通过调节弗林蛋白酶和组织蛋白酶影响病毒进入细胞的过程。

综上, GRP94作为辅助受体与HHV-6糖蛋白相互作用, 促进HHV-6在黏附细胞后进入, 但涉及的具体结合位点目前尚不清楚。此外, GRP94作为伴侣细胞受体, 在发挥作用过程中需要ATPase活性, 因此特定的抑制剂可以ATP竞争位点作为靶点。我们猜想, GRP94通过与弗林蛋白酶或组织蛋白酶L的结合, 可能参与了几种高致病性病毒包膜蛋白的裂解。尽管关于GRP94与病毒结合的机制尚未完全明确, 但是以上的发现为GRP94成为广谱抗

病毒靶点提供了强有力的证据。过表达的GRP94与受轮状病毒感染细胞及预后不良的乙肝病毒感染者相关^[44]。Kim等^[45]认为, GRP94与乙肝病毒聚合酶有关, 并且是人肝母细胞瘤来源的HepG2细胞株中以活性构象产生乙肝病毒聚合酶必需的。GRP94影响病毒的相关机制可能为通过消除抑制病毒复制的错误折叠病毒蛋白, 在促进病毒蛋白折叠中发挥作用^[46,47]。此外, 在登革病毒(Dengue virus, DENV)和寨卡病毒(Zika virus, ZIKV)的感染周期中, 敲除GRP94基因可通过减少包膜、非结构蛋白的合成和病毒产量来抑制2型登革病毒(DENV2)在人肝癌Huh-7细胞株中的复制^[48]。GRP94的特异性抑制剂PU-WS13是一种新开发的潜在抗癌抑制剂, 它的作用机制是占据GRP94的ATP结合位点以此阻断GRP94的ATPase活性, 该化合物可降低DENV2和ZIKV病毒的滴度^[49], 并且对4种DENV血清型、不同ZIKV毒株以及不同细胞系均有抗病毒活性^[43]。

3.2 肿瘤

在肿瘤的发生发展过程中, 缺氧、氧化还原平衡失调、细胞代谢改变、酸中毒、细胞增殖、蛋白质合成增加等应激条件均会触发ERS和UPR, 导致GRP94表达增加, 以维护内环境稳态并抑制肿

瘤细胞的凋亡^[50]。GRP94对肿瘤的影响机制主要为以下3类。(1) GRP94在肿瘤发生中通过促进癌症相关蛋白质的折叠来支持癌症进展^[26]。(2) GRP94通过TLRs和整合素的折叠在肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAMs)的功能中发挥重要作用,而TAMs通过产生细胞因子、趋化因子、活性氧类、活性氮类等促进肿瘤生长和转移^[51]。另外,TAMs内源性GRP94通过促进Wnt信号通路激活以支持肿瘤的发生^[52]。(3)细胞表面GRP94通过细胞表面受体参与树突细胞成熟。GRP94结合的多肽提呈至细胞毒性T淋巴细胞,同时启动针对肿瘤特定抗原的特异性T细胞反应。此外,糖蛋白A为主重复序列蛋白(glycoprotein A repetitions predominant, GARP)作为GRP94的靶向客户蛋白被转移到细胞表面,激活调节性T细胞,随后调节性T细胞介导效应T细胞的抑制,导致免疫抑制^[52,53]。GRP94在多种类型的肿瘤中过表达,这在临床上预示着癌症晚期和不良的预后,如头颈部癌、结肠癌、胆囊癌、乳腺癌等^[54-56]。过表达的GRP94可促进癌症的生长和转移,如肝细胞癌、多发性骨髓瘤、卵巢癌和炎性结肠癌^[50,57,58]。以乳腺癌为例,细胞表面GRP94在恶性乳腺组织中特异表达,而在良性组织中不表达^[59]。有研究表明,三阴性乳腺癌脑转移与GRP94上调相关,GRP94在此过程中可通过Wnt/ β -catenin信号通路参与支持生存的自噬起作用^[60-62];雌激素受体(estrogen receptor, ER)- α 36在乳腺癌中过度表达,并参与三苯氧胺耐药。Li等^[63]通过靶向GRP94的siRNA或单抗阻断了GRP94与ER- α 36的相互作用,最终使乳腺癌的生长和侵袭受到抑制,从而发现GRP94可调节乳腺癌细胞膜上ER- α 36的表达和信号转导。此外,人表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)作为蛋白酪氨酸激酶参与上调许多癌症驱动信号通路,GRP94可调节HER2的初生型和成熟型的稳定性^[64](图3)。Patel等^[65]使用PU-WS13特异性抑制GRP94后,膜HER2分子转移到早期的内吞体和质膜相邻溶酶体内,从而阻止下行信号,表明GRP94是维持质膜上高密度HER2元件结构所必需的,并且表面GRP94可能参与了HER2阳性乳腺癌的恶性进展。靶向GRP94 ATP结合区的 α 螺旋肽p37作为一种特异性单抗破坏

了HER2的二聚化并导致HER2的降解,从而抑制了肿瘤细胞的生长并增加了细胞的凋亡^[63,66]。这些结果为乳腺癌细胞依赖GRP94生存提供了新的见解,并提示GRP94可能成为HER2或ER-A36过表达型乳腺癌的潜在治疗靶点。

以上研究为靶向GRP94进行抗肿瘤治疗提供了基础。基于GRP94的肿瘤疫苗、小分子抑制剂和单抗的开发将为癌症治疗开辟新的领域。近来,靶向GRP94而设计的抗肿瘤疫苗有效预防了甲基胆蒽诱导的纤维肉瘤^[67],靶向GRP94的特异性单抗可用作抑制肿瘤组织生长和发展的有力工具。因此,更多学者对抑制GRP94的化学物质产生了更为浓厚的兴趣,他们认为更多潜在的抗癌药物将被发掘,但主要的挑战仍在于化学抑制剂对其他Hsp90家族成员的广泛抑制可能导致正常细胞中依赖它们的重要生物学过程被中断。这凸显了开发更具特异性和选择性的抗癌药物的必要性。因此,研发GRP94选择性抑制剂而不是Hsp90广泛抑制剂将会在临床达到更好的治疗效果。有研究发现,当同时抑制内质网管腔内GRP94和细胞表面GRP94时,由于抑制剂的高分子特性致其无法穿透质膜,因此以细胞表面GRP94为靶向的抑制剂更加安全,这是将来抑制肿瘤发展与转移的有效新策略之一^[68]。

3.3 神经退行性疾病

神经退行性疾病带来的影响之一是错误折叠的蛋白质在大部分细胞间隔内积累和聚集,ERS、UPR和热激蛋白过表达等细胞应激反应是这些错误蛋白质聚集的保护性机制^[69]。内质网伴侣GRP94作为内质网质量控制中的关键一员,协助重折叠或处理错误折叠的蛋白质^[25,70](图3)。这可能使GRP94的相关药物能够成为治疗涉及错误折叠蛋白的中枢神经疾病的一种手段。Labrador等^[71]研究发现,GRP94能够有效作用于 α -突触核蛋白,并调节相关免疫反应,是免疫反应的潜在调节器。Villadiego等^[72]发现,由 α -突触核蛋白和GRP94分子伴侣结合组成的疫苗可以在外周系统发挥显著和持久的效应,作用机制为通过抑制慢性帕金森病小鼠模型的慢性小胶质细胞激活而对中枢神经系统产生影响。

3.4 其他疾病

在动脉粥样硬化、肥胖和糖尿病等导致的内质网应激的疾病中, GRP94通过折叠新合成的蛋白质和促进蛋白质稳态来参与内质网质量控制过程(图3)。有研究发现, GRP94对胰腺 β 细胞的调控和发育至关重要, 这为维持或增强 β 细胞的功能提供了新的治疗策略^[73]。GRP94也可通过抑制细胞凋亡在衰老过程中发挥关键作用^[74]。在衰老和癌细胞中, 促进细胞损伤和破坏的信号通路是相似的, 因此针对特定Hsp90亚型如GRP94的新抑制剂开发可能是健康老龄化的一个有前途的方向, 但是还需要进一步的实验来证明此假设。

4 结语

GRP94通过其庞大的客户蛋白网络在生理及病理状态下的细胞中发挥作用。作为Hsp90的一员, GRP94的功能及其与疾病的关系与本身的结构密切相关, 尤其是其关键的四个结构域。GRP94的辅助蛋白折叠是其发挥功能的基础, 它能够通过调节自身在细胞内和/或细胞膜的表达直接或间接影响客户蛋白的表达, 进而改变多种细胞生物学功能。如上所述, GRP94可以通过Wnt信号通路辅助细胞表面受体和其他关键途径成员的折叠, 以癌细胞固有的方式支持肿瘤的发生, 还可通过TLRs的结合及转运促进免疫抑制细胞激活。目前研究较多的肿瘤疾病与GRP94的过表达与侵袭性表型相关。GRP94作为预后标记物, 在癌细胞的进展和转移中发挥关键作用, 因此它具有作为生物标志物和治疗靶点的强大潜力, GRP94选择性抑制剂可能对多发性骨髓瘤等对蛋白质折叠需求很高的肿瘤非常有效。另外, 高致病性病毒进入细胞时GRP94有助于病毒靶向客户蛋白进入, 目前尚不清楚是否需要GRP94分子伴侣循环的ATPase活性, 未来需要进一步的研究来确定GRP94在病毒包膜蛋白的蛋白酶激活中的作用, 以便利用GRP94作为辅助受体来抑制病毒进入细胞。基于GRP94的神经退行性疾病疫苗、小分子抑制剂和单抗的开发将为相关疾病的治疗开辟新的领域, 然而一些严重的不良反应如非靶点效应引起的肝毒性导致临床试验难以顺利进行。更加深入地了解GRP94的分子结构、生理作用功能及调节、客户蛋白网络将有利

于进一步开发特异性GRP94抑制剂。到目前为止, 完整的GRP94客户蛋白网络仍然未知, 探索GRP94相关功能的主要方法是通过应用高度特异性的抑制剂来促进或抑制它们与客户蛋白的相互作用, 如何用已知的信息改善人类健康仍旧是未来研究的热点。

参考文献

- [1] Metzger MB, Scales JL, Dunkleberger MF, et al. A protein quality control pathway at the mitochondrial outer membrane. *Elife*, 2020, 9: e51065
- [2] Dubey AR, Patwa SM, Kinger S, et al. Improper proteostasis: can it serve as biomarkers for neurodegenerative diseases? *Mol Neurobiol*, 2022, 59(6): 3382-3401
- [3] Lei W, Duron DI, Stine C, et al. The alpha isoform of heat shock protein 90 and the co-chaperones p23 and cdc37 promote opioid anti-nociception in the brain. *Front Mol Neurosci*, 2019, 12: 294
- [4] Hua Y, White-Gilbertson S, Kellner J, et al. Molecular chaperone gp96 is a novel therapeutic target of multiple myeloma. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(22): 6242-6251
- [5] Jackson SE. Hsp90: structure and function. *Top Curr Chem*, 2013, 328: 155-240
- [6] Peters I, Müller S, Küchler C, et al. The heat shock protein 90 (HSP90) is required for the IL-33-induced cytokine production in mast cells (MCs). *Int J Mol Sci*, 2022, 23(18): 10855
- [7] Biebl MM, Buchner J. Structure, function, and regulation of the HSP90 machinery. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2019, 11(9): a034017
- [8] Marzec M, Eletto D, Argon Y. GRP94: an HSP90-like protein specialized for protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1823(3): 774-787
- [9] Krukenberg KA, Böttcher UMK, Southworth DR, et al. Grp94, the endoplasmic reticulum Hsp90, has a similar solution conformation to cytosolic Hsp90 in the absence of nucleotide. *Protein Sci*, 2009, 18(9): 1815-1827
- [10] Pugh KW, Alnaed M, Brackett CM, et al. The biology and inhibition of glucose-regulated protein 94/gp96. *Medicinal Res Rev*, 2022, 42(6): 2007-2024
- [11] Frey S, Leskova A, Reinstein J, et al. The ATPase cycle of the endoplasmic chaperone Grp94. *J Biol Chem*, 2007, 282(49): 35612-35620
- [12] Dutta T, Singh H, Edkins AL, et al. Hsp90 and associated co-chaperones of the malaria parasite. *Biomolecules*, 2022, 12(8): 1018
- [13] Mak OW, Chand R, Reynisson J, et al. Identification of

- isoform-selective ligands for the middle domain of heat shock protein 90 (Hsp90). *Int J Mol Sci*, 2019, 20(21): 5333
- [14] Edkins AL, Boshoff A. General structural and functional features of molecular chaperones. *Adv Exp Med Biol*, 2021, 1340: 11-73
- [15] Jahn M, Rehn A, Pelz B, et al. The charged linker of the molecular chaperone Hsp90 modulates domain contacts and biological function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(50): 17881-17886
- [16] Biswas C, Ostrovsky O, Makarewich CA, et al. The peptide-binding activity of GRP94 is regulated by calcium. *Biochem J*, 2007, 405(2): 233-241
- [17] Harley CA, Jesus CSH, Carvalho R, et al. Changes in channel trafficking and protein stability caused by LQT2 mutations in the PAS domain of the HERG channel. *PLoS One*, 2012, 7(3): e32654
- [18] Kohli E, Causse S, Baverel V, et al. Endoplasmic reticulum chaperones in viral infection: therapeutic perspectives. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2021, 85(4): e0003521
- [19] Yang Y, Liu B, Dai J, et al. Heat shock protein gp96 is a master chaperone for toll-like receptors and is important in the innate function of macrophages. *Immunity*, 2007, 26(2): 215-226
- [20] Morales C, Wu S, Yang Y, et al. *Drosophila* Glycoprotein 93 is an ortholog of mammalian heat shock protein gp96 (grp94, HSP90b1, HSPC4) and retains disulfide bond-independent chaperone function for TLRs and integrins. *J Immunol*, 2009, 183(8): 5121-5128
- [21] Staron M, Wu S, Hong F, et al. Heat-shock protein gp96/ grp94 is an essential chaperone for the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex. *Blood*, 2011, 117(26): 7136-7144
- [22] Chen WT, Tseng CC, Pfaffenbach K, et al. Liver-specific knockout of GRP94 in mice disrupts cell adhesion, activates liver progenitor cells, and accelerates liver tumorigenesis. *Hepatology*, 2014, 59(3): 947-957
- [23] Huck JD, Que NL, Hong F, et al. Structural and functional analysis of GRP94 in the closed state reveals an essential role for the pre-n domain and a potential client-binding site. *Cell Rep*, 2017, 20(12): 2800-2809
- [24] Vitadello M, Penzo D, Petronilli V, et al. Overexpression of the stress-protein Grp94 reduces cardiomyocyte necrosis due to calcium overload and simulated ischemia. *FASEB J*, 2003, 17(8): 1-20
- [25] Eletto D, Dersh D, Argon Y. GRP94 in ER quality control and stress responses. *Semin Cell Dev Biol*, 2010, 21(5): 479-485
- [26] Argon Y, Bresson SE, Marzec MT, et al. Glucose-regulated protein 94 (GRP94): a novel regulator of insulin-like growth factor production. *Cells*, 2020, 9(8): 1844
- [27] Staron M, Yang Y, Liu B, et al. gp96, an endoplasmic reticulum master chaperone for integrins and Toll-like receptors, selectively regulates early T and B lymphopoiesis. *Blood*, 2010, 115(12): 2380-2390
- [28] Suto R, Srivastava PK. A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides. *Science*, 1995, 269(5230): 1585-1588
- [29] Corigliano MG, Sander VA, Sánchez López EF, et al. Heat shock proteins 90 kDa: immunomodulators and adjuvants in vaccine design against infectious diseases. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 622186
- [30] Zhang Y, Wu BX, Metelli A, et al. GP96 is a GARP chaperone and controls regulatory T cell functions. *J Clin Invest*, 2015, 125(2): 859-869
- [31] Calderwood SK, Gong J, Murshid A. Extracellular HSPs: the complicated roles of extracellular HSPs in immunity. *Front Immunol*, 2016, 7: 2122
- [32] Tamir H, Melamed S, Erez N, et al. Induction of innate immune response by TLR3 agonist protects mice against SARS-CoV-2 infection. *Viruses*, 2022, 14(2): 189
- [33] Carty M, Guy C, Bowie AG. Detection of viral infections by innate immunity. *Biochem Pharmacol*, 2021, 183: 114316
- [34] Ma J, Jia J, Jiang X, et al. gp96 is critical for both human herpesvirus 6A (HHV-6A) and HHV-6B infections. *J Virol*, 2020, 94(13): e00311
- [35] Nikolic J, Belot L, Raux H, et al. Structural basis for the recognition of LDL-receptor family members by VSV glycoprotein. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1029
- [36] Prusty BK, Siegl C, Gulve N, et al. GP96 interacts with HHV-6 during viral entry and directs it for cellular degradation. *PLoS One*, 2014, 9(12): e113962
- [37] Seidah NG, Pasquato A, Andréo U. How do enveloped viruses exploit the secretory proprotein convertases to regulate infectivity and spread? *Viruses*, 2021, 13(7): 1229
- [38] Coutard B, Valle C, de Lamballerie X, et al. The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antiviral Res*, 2020, 176: 104742
- [39] Hoffmann M, Kleine-Weber H, Pöhlmann S. A multibasic cleavage site in the spike protein of SARS-CoV-2 is essential for infection of human lung cells. *Mol Cell*, 2020, 78(4): 779-784
- [40] Shang J, Wan Y, Luo C, et al. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(21): 11727-11734
- [41] Lavie M, Dubuisson J, Belouzard S. SARS-CoV-2 spike

- furin cleavage site and S2' basic residues modulate the entry process in a host cell-dependent manner. *J Virol*, 2022, 96(13): e0047422
- [42] Shevtsov M, Balogi Z, Khachatryan W, et al. Membrane-associated heat shock proteins in oncology: from basic research to new theranostic targets. *Cells*, 2020, 9(5): 1263
- [43] Chaumonnot K, Masson S, Sikner H, et al. The HSP GRP94 interacts with macrophage intracellular complement C3 and impacts M2 profile during ER stress. *Cell Death Dis*, 2021, 12(1): 114
- [44] Kawai T, Akira S. Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol*, 2006, 7(2): 131-137
- [45] Kim SS, Shin HJ, Cho YH, et al. Expression of stable hepatitis B viral polymerase associated with GRP94 in *E. coli*. *Arch Virol*, 2000, 145(7): 1305-1320
- [46] Slaine PD, Kleer M, Duguay BA, et al. Thiopurines activate an antiviral unfolded protein response that blocks influenza A virus glycoprotein accumulation. *J Virol*, 2021, 95(11): e00453
- [47] Prasad V, Greber UF. The endoplasmic reticulum unfolded protein response-homeostasis, cell death and evolution in virus infections. *FEMS Microbiol Rev*, 2021, 45(5): fuab016
- [48] Rothan HA, Zhong Y, Sanborn MA, et al. Small molecule grp94 inhibitors block dengue and Zika virus replication. *Antiviral Res*, 2019, 171: 104590
- [49] Zhang J, Li H, Liu Y, et al. Targeting HSP90 as a novel therapy for cancer: mechanistic insights and translational relevance. *Cells*, 2022, 11(18): 2778
- [50] Duan X, Iwanowycz S, Ngoi S, et al. Molecular chaperone GRP94/GP96 in cancers: oncogenesis and therapeutic target. *Front Oncol*, 2021, 11: 629846
- [51] Liu B, Yang Y, Qiu Z, et al. Folding of Toll-like receptors by the HSP90 paralogue gp96 requires a substrate-specific cochaperone. *Nat Commun*, 2010, 1(1): 79
- [52] Morales C, Rachidi S, Hong F, et al. Immune chaperone gp96 drives the contributions of macrophages to inflammatory colon tumorigenesis. *Cancer Res*, 2014, 74(2): 446-459
- [53] Dai J, Liu B, Caudill MM, et al. Cell surface expression of heat shock protein gp96 enhances cross-presentation of cellular antigens and the generation of tumor-specific T cell memory. *Cancer Immun*, 2003, 3: 1
- [54] Duan XF, Xin YW. Overexpression of molecule GRP94 favors tumor progression in lung adenocarcinoma by interaction with regulatory T cells. *Thorac Cancer*, 2020, 11(3): 704-712
- [55] Hu T, Xie N, Qin C, et al. Glucose-regulated protein 94 is a novel glioma biomarker and promotes the aggressiveness of glioma via Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Tumor Biol*, 2015, 36(12): 9357-9364
- [56] Dejeans N, Glorieux C, Guenin S, et al. Overexpression of GRP94 in breast cancer cells resistant to oxidative stress promotes high levels of cancer cell proliferation and migration: implications for tumor recurrence. *Free Radical Biol Med*, 2012, 52(6): 993-1002
- [57] Wei PL, Huang CY, Tai CJ, et al. Glucose-regulated protein 94 mediates metastasis by CCT8 and the JNK pathway in hepatocellular carcinoma. *Tumor Biol*, 2016, 37(6): 8219-8227
- [58] Qi J, Yu Y, Akilli Öztürk Ö, et al. New Wnt/ β -catenin target genes promote experimental metastasis and migration of colorectal cancer cells through different signals. *Gut*, 2016, 65(10): 1690-1701
- [59] Albakova Z, Mangasarova Y, Albakov A, et al. HSP70 and HSP90 in cancer: cytosolic, endoplasmic reticulum and mitochondrial chaperones of tumorigenesis. *Front Oncol*, 2022, 12: 829520
- [60] Martínez-Aranda A, Hernández V, Guney E, et al. FN14 and GRP94 expression are prognostic/predictive biomarkers of brain metastasis outcome that open up new therapeutic strategies. *Oncotarget*, 2015, 6(42): 44254-44273
- [61] Santana-Codina N, Muixí L, Foj R, et al. GRP94 promotes brain metastasis by engaging pro-survival autophagy. *Neuro-Oncology*, 2020, 22(5): 652-664
- [62] 刘璐璐, 高建伟, 李长菲, 等. PEG修饰有效提高热休克蛋白gp96抑制性多肽抗乳腺癌的功能. *生物工程学报*, 2022, 38(9): 3363-3378
- [63] Li X, Sun L, Hou J, et al. Cell membrane gp96 facilitates HER2 dimerization and serves as a novel target in breast cancer. *Int J Cancer*, 2015, 137(3): 512-524
- [64] Wang T, Yang L, Li C, et al. Comprehensive analysis reveals GRP94 is associated with worse prognosis of breast cancer. *Transl Cancer Res*, 2021, 10(1): 298-309
- [65] Patel PD, Yan P, Seidler PM, et al. Paralog-selective Hsp90 inhibitors define tumor-specific regulation of HER2. *Nat Chem Biol*, 2013, 9(11): 677-684
- [66] Li X, Wang B, Liu W, et al. Blockage of conformational changes of heat shock protein gp96 on cell membrane by a α -helix peptide inhibits HER2 dimerization and signaling in breast cancer. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0124647
- [67] Kovalchin JT, Murthy AS, Horattas MC, et al. Determinants of efficacy of immunotherapy with tumor-derived heat shock protein gp96. *Cancer Immun*, 2001, 1: 7
- [68] Wang L, Xu X, Jiang Z, et al. Modulation of protein fate decision by small molecules: targeting molecular chaperone machinery. *Acta Pharmaceutica Sin B*, 2020, 10(10): 1904-1925

- [69] Xiang C, Wang Y, Zhang H, et al. The role of endoplasmic reticulum stress in neurodegenerative disease. *Apoptosis*, 2017, 22(1): 1-26
- [70] Amankwah YS, Collins P, Fleifil Y, et al. Grp94 works upstream of BiP in protein remodeling under heat stress. *J Mol Biol*, 2022, 434(19): 167762
- [71] Labrador-Garrido A, Cejudo-Guillén M, Daturpalli S, et al. Chaperome screening leads to identification of Grp94/Gp96 and FKBP4/52 as modulators of the α -synuclein-elicited immune response. *FASEB J*, 2016, 30(2): 564-577
- [72] Villadiego J, Labrador-Garrido A, Franco JM, et al. Immunization with α -synuclein/Grp94 reshapes peripheral immunity and suppresses microgliosis in a chronic Parkinsonism model. *Glia*, 2018, 66(1): 191-205
- [73] Kim DS, Song L, Wang J, et al. GRP94 Is an essential regulator of pancreatic β -cell development, mass, and function in male mice. *Endocrinology*, 2018, 159(2): 1062-1073
- [74] Fuhrmann-Stroissnigg H, Niedernhofer LJ, Robbins PD. Hsp90 inhibitors as senolytic drugs to extend healthy aging. *Cell Cycle*, 2018, 17(9): 1048-1055