

Christin Wittwer und Stefan Holdenrieder*

Immunogene Zelltodmarker HMGB1 und sRAGE als neue prädiktive und prognostische Serum Biomarker bei Tumorerkrankungen

Immunogenic cell death markers HMGB1 and sRAGE as new predictive and prognostic serum biomarkers in cancer disease

Zusammenfassung: Immunogene Zelltodmarker sind eine inhomogene Gruppe von Molekülen, die während Zelltodprozessen wie Apoptose, Nekrose oder weiteren Formen freigesetzt werden. Je nach Zusammensetzung des extrazellulären Milieus können diese „Danger associated molecular patterns“ (DAMPs) wie das „High mobility group box 1“ (HMGB1) Protein das Immunsystem stimulierend oder inhibierend beeinflussen. Bei Tumorerkrankungen scheint eine kontinuierliche Freisetzung von HMGB1, u.a. über eine Vermittlung durch den zellulären Bindungspartner „Receptor of advanced glycation end products“ (RAGE), zu einer Förderung des Tumorwachstums zu führen, während die pulsatile Freisetzung während zytotoxischer Therapie zu einer verbesserten antitumorösen Immunantwort beitragen könnte. Lösliches RAGE (sRAGE) kann hingegen die Effekte von extrazellulärem HMGB1 abpuffern. In diesem Review werden die strukturellen und funktionalen Charakteristika dieser immunogenen Zelltodmarker sowie ihre Rolle in der Pathophysiologie von nicht-malignen und malignen Erkrankungen vorgestellt; sodann wird ihre Relevanz als Serum-Biomarker für die Diagnose, die Prognoseabschätzung, die Prädiktion und das Monitoring des Ansprechens einer zytotoxischen Therapie bei Tumorpatienten beleuchtet. Bei Patienten mit verschiedenen Tumorerkrankungen wurden im Vergleich zu gesunden Personen erhöhte Serumkonzentrationen von HMGB1 und niedrigere sRAGE-Werte gefunden. Zudem waren hohe HMGB1- und niedrige sRAGE-Serumwerte vor und während einer zytotoxischen Therapie mit einem unzureichenden Ansprechen auf die Behandlung und einem kürzeren Überleben assoziiert. Diese Ergebnisse weisen die immunogenen Zelltodmarker HMGB1 und sRAGE als neue, vielversprechende Biomarker zur Abschätzung der Prognose, Stratifikation der Patienten und zum Therapiemonitoring bei Tumorpatienten aus.

Schlüsselwörter: HMGB1; immunogener Zelltod; Prädiktion; Prognose; sRAGE.

Abstract: Immunogenic cell death markers are an inhomogeneous group of molecules which are released from apoptotic, necrotic or otherwise dying cells. Once in the extracellular milieu, these danger associated molecular patterns (DAMPs) such as the high mobility group box 1 protein (HMGB1) are able to exert activating and suppressive effects on the immunity system. On the one hand, continuously released HMGB1 – via interaction with its cellular binding partner receptor of advanced glycation end products (RAGE) – can promote tumor growth, whereas, on the other hand, pulsatile release of HMGB1 during cytotoxic therapies may activate the immunity system against tumor cells. Soluble RAGE (sRAGE), however, can act as a decoy receptor, balancing the extracellular effects of HMGB1. Here, we review the structural and functional characteristics of these immunogenic cell death markers and their role in the pathophysiology of diverse benign and malignant diseases. Further, we report on their relevance as serum biomarkers for the diagnosis, estimation of prognosis, as well as the prediction and monitoring of response to cytotoxic therapy in cancer patients. Elevated levels of HMGB1 and lower levels of sRAGE were found to be present in blood of patients suffering from various tumor entities as compared with healthy controls. Furthermore, high HMGB1 and low sRAGE serum levels of cancer patients before or during cytotoxic therapy were associated with poor treatment response and shortened overall survival. These results indicate that immunogenic cell death markers such as HMGB1 and sRAGE are promising new biomarkers for prognosis, patients' stratification and therapy monitoring in cancer patients.

Keywords: HMGB1; immunogenic cell death; prediction; prognosis; sRAGE.

***Korrespondenz:** PD Dr. Stefan Holdenrieder, Institut für Klinische Chemie und Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Bonn, Sigmund-Freud-Str. 25, 53127 Bonn, Deutschland, Tel.: +49 228 28712126, Fax: +49 228 28712159, E-Mail: Stefan.Holdenrieder@uni-bonn.de
Christin Wittwer: Institut für Klinische Chemie, Klinikum der Universität München, München, Deutschland

Einführung

Wesentliche Indikationen für den Einsatz von Serum-Biomarkern bei Tumorpatienten sind die Unterstützung der Differenzialdiagnose einer Tumorerkrankung, die Abschätzung der Prognose, die Prädiktion und das Monitoring einer zytotoxischen Therapie sowie die frühzeitige Erkennung einer Rezidivkrankung in der Nachsorgesituation [1, 2]. Vor dem Hintergrund immer wirksamerer therapeutischer Möglichkeiten selbst in fortgeschrittenen Tumorstadien und angesichts der damit verbundenen erheblichen Kostensteigerungen besteht zunehmender Bedarf, für den individuellen Patienten bereits vor Behandlungsbeginn das wahrscheinliche Ansprechen einzelner Therapieoptionen abzuschätzen und während der Therapie zuverlässig deren Wirksamkeit zu überprüfen, um rechtzeitig eine Umstellung der Behandlung vornehmen zu können.

Für die prätherapeutische Prognoseabschätzung und die Stratifizierung von Patienten für spezielle Therapien werden klinische und zunehmend molekularbiologische Faktoren herangezogen [3, 4]. Die Evaluation des Ansprechens einer Tumorthherapie wird meist anhand der makroskopischen Veränderungen der Tumorgroße durchgeführt, die mittels RECIST-Kriterien objektiviert werden und weithin anerkannt sind [5]. Allerdings unterliegt auch die Beurteilung des Therapieansprechens in den bildgebenden Verfahren relevanten Einschränkungen: Die Sonografie ist stark Untersucher-abhängig und in Schnittbildverfahren können Umgebungsreaktionen wie z.B. eine desmoplastische Stromareaktion oder Bestrahlungsnarben die Größenbestimmung einer Tumorerkrankung erschweren [6, 7]. Die in den RECIST-Kriterien verwendete eindimensionale Ausmessung des Tumors kann fälschlicherweise auch zur Unterschätzung des Therapieansprechens führen, wenn der Tumor inhomogen einschmilzt, abgestorbenes Tumorgewebe nicht abgeräumt wird oder der Tumor bei stabilem Volumen nur an metabolischer Aktivität verliert [8]. Die sensitivere Methode der

Positronen-Emissions-Computertomographie (PET-CT) bildet gleichzeitig morphologische und funktionelle Veränderungen ab, ist jedoch mit einer hohen Strahlenbelastung verbunden, kostenintensiv und nur in speziellen Zentren verfügbar. Die Diffusions-gewichtete (DW) und dynamisch Kontrast-verstärkte (DCE) Magnetresonanztomographie (MRT) berücksichtigt ebenso funktionelle Aspekte, Gewebs- und Perfusionsunterschiede, ist allerdings mit hohem Kosten- und Zeitaufwand verbunden und nur an große Häuser angebunden. [9, 10] Die Charakterisierung der Tumorbiologie gelingt am überzeugendsten durch histopathologische Untersuchungen. Als Nachteile schlagen hier jedoch die invasive Gewinnung des Probenmaterials, die serielle Analysen in der Regel nicht praktikabel macht, und die potentielle Unterschätzung der Heterogenität eines Tumors bei einer einmaligen Untersuchung [11] zu buche.

Eine viel versprechende Alternative zur Prognoseabschätzung und Evaluation des Therapieansprechens bietet sich in Form von im Blut zirkulierenden Biomarkern, die mit der Aktivität, Invasivität, Proliferation und dem Zelltod des Tumors assoziiert sind oder die Immunantwort auf die Tumorerkrankung oder Tumorbehandlung widerspiegeln. Diese können minimalinvasiv über eine einfache Venenpunktion gewonnen werden und eignen sich somit auch für serielle Bestimmungen. Zudem können sie schnell und kostengünstig mit robusten, reproduzierbaren und qualitätskontrollierten Methoden quantifiziert werden und objektivieren so die biochemische Veränderung des Tumors oder des Organismus auf die Behandlung [2, 12]. Bei vielen Tumorentitäten haben sich onkologische Biomarker für die Therapiekontrolle etabliert, z.B. PSA beim Prostatakarzinom, CEA beim kolorektalen Karzinom und CA19-9 beim Pankreaskarzinom [2, 13, 14]. Allerdings wird der Informationsgehalt der Biomarkerkinetiken nur bedingt ausgeschöpft: Die Anwendung von Biomarkerpanels und die Definition klarer Richtlinien für die Interpretation der individuellen Markerverläufe würde die diagnostische Aussagekraft bei vielen Tumorarten steigern [10]. Forschungsbemühungen der letzten Jahre in den Bereichen Genomics, Epigenomics, Proteomics und Metabolomics haben zudem zu einer Vielzahl neuer „Kandidatenmarker“ geführt. Von diesen wurde allerdings nur ein kleiner Teil ausführlich in klinischen Studien geprüft und nur wenige erreichten das Stadium des Einsatzes in der klinischen Routinediagnostik [15].

Im Idealfall könnte man von den Biomarkerwerten direkt auf die Tumoraktivität bzw. den Tumorzelluntergang schließen, schon lange bevor makroskopische Veränderungen in der Bildgebung sichtbar werden. Biomarker, die mit Zelltod in Zusammenhang stehen und

dabei regelmäßig in den Blutkreislauf gelangen, haben sich dafür als vielversprechend erwiesen, da sowohl mit zunehmendem Zellumsatz bei gesteigertem Tumorstadium wie auch bei gezielt zytotoxischer Chemotherapie massiv Zelluntergang stattfindet [3, 16]. So wurde wiederholt eine erhöhte Serum- und Plasmakonzentration des Zelltodmarkers Nucleosomes bei Tumorkranken berichtet. Während einer zytotoxischen Chemo- und Radiotherapie stiegen die Nucleosome-Werte während der ersten Tage z.T. deutlich weiter an, um binnen einer Woche wieder auf den prätherapeutischen Ausgangswerten anzugleichen [16, 17]. Dieser Effekt war dosis- und zeitabhängig [18] und korrelierte mit dem späteren Ansprechen der Patienten auf die Therapie bzw. mit der Prognose der Patienten [19–26]. Interessanterweise war bei allen Studien mit Patienten in fortgeschrittenen Tumorstadien – sowohl unter systemischer als auch unter lokaler zytotoxischer Therapie – ein erhöhter Ausgangswert, ein stärkerer Anstieg der Nucleosome-Werte und ein unzureichender Rückgang während der ersten Therapiewoche mit einem mangelnden Therapieansprechen und einer ungünstigen Prognose assoziiert [19–25]. Bei Patienten mit nichtkleinzelligem und kleinzelligem Lungenkarzinom zeigte die Kombination der Nucleosome mit den etablierten Markern CYFRA 21-1 bzw. ProGRP das Nicht-Ansprechen der Therapie bei einer Untergruppe der Patienten sehr spezifisch und bereits nach einer Therapieanwendung an [21–23]. Dieser Ansatz zur frühzeitigen Beurteilung des Therapieansprechens kann zukünftig genutzt werden, um bei diesen Patienten das radiologische Staging vorzuziehen und bereits frühzeitig auf eine wirksamere Therapie umzustellen.

Erhöhte Nucleosome-Konzentrationen werden auch im Blut von Patienten nach einem Trauma, Schlaganfall, mit einer Sepsis oder mit einer autoimmunen Erkrankung gefunden [16, 27–30]. Immunstimulierende Effekte der Nucleosome sind jedoch bislang nur beim systemischen Lupus erythematosus (SLE) bekannt, bei dem es mitunter zur Triggerung von Anti-Nucleosome-Antikörpern kommen kann, welche mit der Progression der Erkrankung und der Nierenschädigung korrelieren [31]. Möglicherweise trägt die geringere Aktivität der Serum-DNase beim SLE, die an der Degradation und Elimination der Nucleosome aus dem Blut beteiligt ist, zur längeren Persistenz der Nucleosome im Blut und zur nachhaltigen Immunstimulation bei [31, 32]. Inwiefern die erhöhte Serumkonzentration der Nucleosome bei Tumorerkrankungen lediglich den erhöhten Zellumsatz widerspiegelt oder diese ebenfalls eine immunstimulierende Relevanz haben, ist bislang unklar. Jüngste Studien haben einen Zusammenhang der Freisetzungsmuster von Nucleosome, Markern des

immunogenen Zelltods und der DNase-Aktivität auch bei Tumorkranken während einer zytotoxischen Therapie beschrieben. Da eine Stimulation des Immunsystems einerseits die Sensibilität von Tumorzellen gegen Chemotherapeutika erhöhen kann, eine permanente Aktivierung hingegen auch eine Toleranz des Tumorgewebes induzieren kann [33, 34], rücken diese neuen Biomarker und ihre Aussagekraft für die Prognoseabschätzung und das Ansprechen einer Tumorthherapie in den Blickpunkt des Interesses.

Biomarker des immunogenen Zelltods

Beim immunogenen Zelltod, der unterschiedliche morphologische Charakteristika aufweisen kann, kommt es zur Freisetzung von Zelltodprodukten, welche eine spezifische Immunantwort induzieren. Unter anderem wird Calreticulin vom Endoplasmatischen Retikulum an die äußere Plasmamembran der sterbenden Zelle transloziert und ist dort ein wesentliches „eat me“-Signal zur Attraktion von Phagozyten und dendritischen Zellen. Diese phagozytieren dann die Tumorzellen und führen über eine Antigenpräsentation zur Aktivierung von tumorspezifischen zytotoxischen T-Zellen. Primär nicht immunogene Chemotherapie kann durch Absorption von Calreticulin durch Tumorzellen sogar immunogen wirken [35]. Die verzögerte Freisetzung der „Damage associated molecular pattern“ (DAMP) „High molecular group box 1“ (HMGB1) Protein und Adenosintriphosphat (ATP) induzieren ebenso die Kreuzpräsentation von phagozytierten Antigenen und aktivieren auf diesem Wege eine nachhaltige Immunantwort [36]. Da es bislang kaum klinische Studien zu Calreticulin und ATP als Biomarker für die klinische Anwendung gibt, fokussiert dieser Beitrag auf die Biomarker HMGB1 und einen wesentlichen Bindungspartner „receptor for advanced glycation endproducts“ (RAGE), die einerseits eine zentrale Rolle in der Immunstimulation spielen und zudem als lösliche Biomarker im Blut in verschiedenen klinischen Situationen bereits getestet wurden. Interessanterweise zeigen jüngere Forschungsarbeiten, dass HMGB1 nicht nur als DAMP während des nekrotischen Zelltods sondern auch während der späten Apoptose in Assoziation mit Nucleosome freigesetzt wird [37]. Diese Beobachtung rückte die Frage nach der Bedeutung dieser HMGB1-Nucleosome-Komplexe in der Pathogenese von malignen und anderen, z.B. autoimmunen Erkrankungen, sowie als potentieller Biomarker in das Blickfeld.

Struktur und Expression von HMGB1 und sRAGE

HMGB1 ist ein Mitglied der HMG-Box Proteinfamilie und kommt in praktisch jeder menschlichen Zelle vor. Nach seiner Entdeckung und Isolation war es zunächst als nukleäres Strukturprotein betrachtet mit der Fähigkeit, an DNA-Stränge zu binden und diese in ihrer Struktur zu verändern. In den letzten Jahrzehnten intensiver Forschung wurde die Beteiligung von HMGB1 an den wichtigsten Kernprozessen Transkription, Replikation, Rekombination und DNA-Reparatur bekannt; HMGB1 wird daher auch zu den Chaperonen gezählt. Später wurden außerdem seine zahlreichen extrazellulären Funktionen in Rahmen von Immunabwehr, Autoimmunprozessen, Inflammation und Gewebshomöostase erkannt. Die Beteiligung und eventuell bedeutende Rolle in dieser Vielzahl pathologischer Prozesse machte HMGB1 zu einem interessanten Kandidaten in der Suche nach neuen Serum-Biomarkern für Diagnose und Therapiemonitoring bei verschiedenen Erkrankungen.

HMGB1 besteht aus zwei DNA-bindenden Untereinheiten, der A-Box mit dem negativ geladenen Aminosäureterminus, der die intra- und intermolekulare Funktionen moduliert [38, 39] und der B-Box, die mit CpG-A-Oligodesoxynukleotiden interagiert und damit für die Aktivierung dendritischer Zellen und Immunstimulation verantwortlich ist [40, 41]. Beide Boxen binden nicht sequenz-spezifisch an DNA-Stränge, insbesondere an geknickte oder verdrehte DNA und führen zu einer Entwindung oder einer verstärkten Biegung der DNA [39, 42]. Die genetischen Sequenzen für HMGB1 liegen auf Chromosom 13 und enthalten ca. 10.000 Basenpaare. Die Primärstruktur des Proteins besteht aus etwa 214–216 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von ca. 25 kD [43, 44]. Da HMGB1 für seine multiplen Funktionen verschiedenste Konformationsänderungen vornehmen muss, ist es allerdings bis heute nicht gelungen, die Gesamtstruktur oder auch nur die Tertiärstruktur des ganzen Moleküls zu definieren [45]. Erst durch posttranslationale Azetylierung und Phosphorylierung wird HMGB1 aktiviert und in spezifische Zellkompartimente verteilt [46].

Die Expression von HMGB1 wird von vielen verschiedenen Transkriptionsfaktoren gesteuert, darunter auch p53 und c-myc [47, 48]. Da es im Überfluss in so gut wie allen Zellen des menschlichen Körpers exprimiert wird, wurde es zunächst für ein „housekeeping gene“ gehalten; allerdings zeigte sich bald, dass die Expression in verschiedenen Zellpopulationen massiv variieren kann [reviewed in 49]. Die intrazelluläre Konzentration kann dabei um das 100-fache schwanken – vermutlich in Abhängigkeit

vom Differenzierungsgrad des jeweiligen Gewebes [50]. Dies würde die extrem hohe intrazelluläre Expression in malignen, also dedifferenzierten, Tumorzellen erklären [49] und ist ein besonders interessanter Aspekt für die Nutzung von HMGB1 als Biomarker.

RAGE besteht als Transmembranprotein vom Typ I und Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie aus drei Immunglobulin-artigen Domänen, einer Transmembran- und einer zytoplasmatischen Domäne [51]. Zusätzlich zu dieser membranständigen Form gibt es eine lösliche Form von RAGE („soluble RAGE/ sRAGE“), der zwei unterschiedliche Entstehungswege zugrunde liegen können: Zum einen kann sRAGE das Produkt eines alternativen Splicing-Prozesses der RAGE prä-mRNA sein und wird dann als „endogenes, sekretorisches“ RAGE (esRAGE) freigesetzt. Zum anderen kann der extrazelluläre Anteil des membrangebundenen Rezeptors proteolytisch abgespalten werden und wird dann als „abgespaltenes“ oder „cleaved“ RAGE (cRAGE) bezeichnet [52, 53]. Lösliches sRAGE kann an extrazelluläres HMGB1 binden und seine Funktionen neutralisieren; dabei fungiert es dann als Abbausignal oder „decoy receptor“ [54]. Folgerichtig wurde in einer größeren Population gesunder Freiwilliger (n=626) eine inverse Korrelation von HMGB1 und sRAGE festgestellt [55].

Funktionen von HMGB1 und RAGE

Intrazellulär übernimmt HMGB1 als Chaperon mit seinen DNA-strukturverändernden Funktionen vielfältige Aufgaben im Rahmen der Transkription, Replikation und Rekombination, sowie bei der DNA-Reparatur. Im Hinblick auf die potentielle Rolle von HMGB1 als Serum-Verlaufsmarker soll allerdings im Folgenden vor allem auf die extrazellulären Funktionen von HMGB1 eingegangen werden.

HMGB1 wird von nekrotischen und apoptotischen Zellen oder Zellen des angeborenen Immunsystems über verschiedene Mechanismen in den Extrazellulärraum freigesetzt (siehe unten), wo es als DAMP seine extrazellulären Funktionen über Bindung an verschiedenste Rezeptoren ausübt, darunter RAGE, die toll-like-Rezeptoren (TLR) 2, 4 und 9, sowie CD24. [reviewed in 56] Eine Übersicht über die verschiedenen HMGB1-Rezeptoren und ihre zugehörigen intrazellulären Signalkaskaden findet sich in Abbildung 1.

RAGE ist der bevorzugte Rezeptor von HMGB1, er befindet sich als membranständiger Rezeptor auf den Oberflächen verschiedenster Immun- und Epithelzellen und kann neben „advanced glycation end products

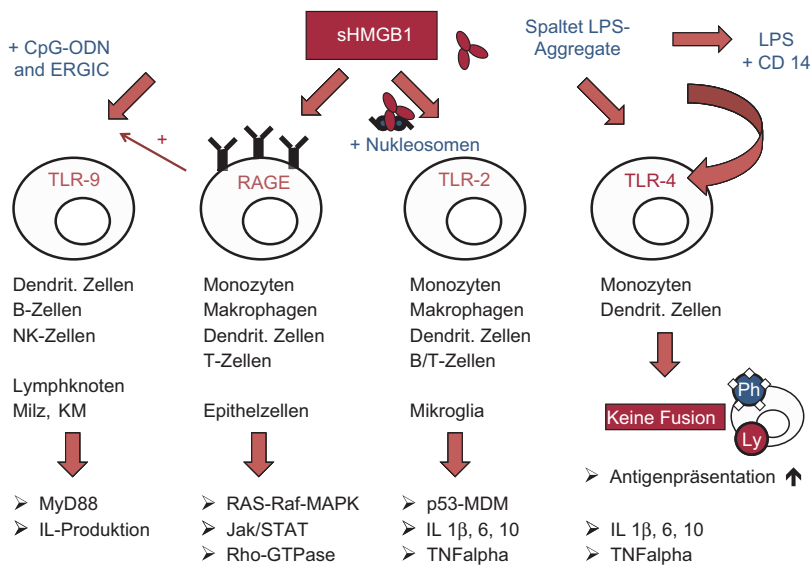


Abbildung 1 HMGB1-Rezeptoren und ihre intrazellulären Signalwege. (Details im Text; modifiziert nach [57])

(AGEs)“ wie HMGB1 auch Proteine der S100-Familie sowie DNA, RNA, Serum Amyloid und Immunglobulin-Leichtketten binden. Durch diese Interaktionen ist RAGE an vielfältigen pathologischen Abläufen beteiligt, etwa bei malignen und chronischen Krankheiten oder systemischen Entzündungszuständen wie Sepsis und Trauma [58, 59]. Die Bindungsstelle für HMGB1 an RAGE konnte bis jetzt noch nicht eindeutig identifiziert werden, allerdings zeigen Experimente mit rekombinanten Bindungspartnern eine Konzentrations- und Zeit-abhängige Bindung, die auch einen Sättigungsgrad erreichen kann [60].

Die Interaktion von HMGB1 und membranständigen RAGE führt zur Aktivierung vielfältiger intrazellulärer Signalwege, darunter die RAS-RAF-MAP-Kaskade und der Rb2F-Signalweg. Außerdem bestehen Querverbindungen zu p53-MDM [61], Rho-GTPasen [62], Jak/STAT [63] und Mac-152 zudem spielt RAGE eine wichtige Rolle in der DNA-abhängigen Aktivierung von TLR9, sodass RAGE weniger als konventioneller Rezeptor sondern viel mehr als Adapter für verschiedenste Signalwege gesehen werden kann [34]. HMGB1 aktiviert über Bindung an RAGE dendritische Zellen und fördert ihre Reifung, was zur Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 α , IL-6 und TNF- α führt. Darüber hinaus wird das „homing“ der dendritischen Zellen in die Lymphknoten angeregt und so die T-Zell-Differenzierung gefördert [64, 65].

Über Bindung von HMGB1 an TLR-4 wird die Fusion von Phagosomen und Lysosomen in dendritischen Zellen verhindert, was zum verminderten Abbau und damit zur vermehrten Präsentation phagozytierter Fragmente von

apoptotischen Zellen auf der Zellmembran führt [66]. Interessanterweise kann HMGB1 diesen Effekt auch über einen indirekten Weg auslösen und das sogar noch um einiges effektiver: HMGB1 löst Lipopolysaccharid (LPS)-Aggregate auf und sorgt für eine Bindung der LPS-Moleküle an CD14, die im LPS/CD14-Komplex dann an Leukozyten binden und für eine stärkere Produktion von TNF- α führen als HMGB1 oder LPS allein [67].

Nicht immer löst HMGB1 allein eine Rezeptorantwort aus: zur Aktivierung von TLR-2 sind HMGB1-Nukleosomen-Komplexe nötig, die vor allem beim Zellzerfall in der Apoptose entstehen. In vitro wurde gezeigt, dass HMGB1 während der Apoptose fest mit der DNA verbunden bleibt und mit ihren Bruchstücken, den Nukleosomen, aus der Zelle freigesetzt wird [37]. Durch Bindung an TLR-2 kommt es dann zur Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und IL-10, TNF- α und vielen anderen Kostimulatoren. Freie extrazelluläre HMGB1-Nukleosomen-Komplexe können auch zum Verlust der Toleranz körpereigener DNA führen und damit zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen wie dem SLE, bei dem es zur Produktion von anti-dsDNA- und z.T. auch Anti-Nukleosomen-Antikörpern kommt [37, 68].

Gebunden an Einzelstrang-DNA verstärkt HMGB1 deren immunstimulierenden Effekt auf TLR-9, den „kanonischen“ Rezeptor für Einzelstrang-DNA [40, 69, 70]. Schon im ERGIC („endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment“) zwischen dem endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat kann HMGB1 an TLR-9 gebunden sein und die Antwort auf CpG-Oligonucleotide

(ODN) modulieren. Extrazellulär bindet HMGB1 sowohl an CpG-ODN als auch an RAGE, erreicht in diesem Komplex den ERGIC und verursacht MyD88-abhängig eine vermehrte Interleukinproduktion [40, 70].

Auch in Assoziation mit IL-1- β verstärkt HMGB1 dessen proinflammatorische Effekte über Aktivierung des *IL1-Rezeptors* [71]. Auf der anderen Seite verringert eine Bindung von CD24 an HMGB1 dessen immunstimulierenden Wirkungen über einen Siglec-G Signalweg, der exogene Pathogen-assoziierte Moleküle („pathogen-associated molecular patterns“; PAMPs) von endogenen Gefahrensignalen (DAMPs) unterscheiden kann, sodass von einer protektiven Funktion des CD24-HMGB1-Komplexes ausgegangen wird [72]. Um diese widersprüchlichen Funktionen desselben Moleküls zu erklären, wurde angenommen, dass HMGB1 in Verbindung mit proinflammatorischen Molekülen deren Wirkung verstärkt, wohingegen es alleine immunsuppressive und reparative Vorgänge unterstützt [69].

Relevanz von HMGB1 und RAGE für die Pathophysiologie nicht-maligner Erkrankungen

HMGB1 kann das Immunsystem also auf vielfache Weise beeinflussen und es z.B. auch gegen körpereigene Strukturen sensibilisieren. Daher hat es eine wichtige Rolle in der Entstehung von *Autoimmunerkrankungen* wie SLE, Rheumatoider Arthritis (RA), Vaskulitiden, Myositiden und Diabetes mellitus Typ I [73, 74]. Außerdem ist es mit seinen multiplen Regulationsfunktionen an systemischen Entzündungsvorgängen wie Trauma oder Sepsis und an metabolischen Erkrankungen beteiligt.

Wie bereits oben erwähnt, sind Autoantikörper gegen dsDNA und Nukleosomen ein charakteristisches Merkmal des *SLE*. Da freigesetzte Nukleosomen allein nicht in der Lage sind, eine Antikörperproduktion zu induzieren, könnte HMGB1 im Komplex mit freien Nukleosomen der entscheidende Faktor zu sein, der TLR-2-abhängig Antigen-präsentierende Zellen aktiviert und die Antikörperbildung in Gang setzt [68]. In der Tat wurde eine Korrelation zwischen der HMGB1-Konzentration, Anti-dsDNA-Antikörpern sowie der Krankheitsaktivität beschrieben [75]. Daneben scheint die verminderte „Abräumung“ von UV-geschädigten Zellen mit vermehrter Nukleosomen- und HMGB1-Freisetzung an der Entwicklung autoimmun bedingter Hautläsionen beteiligt zu sein [76].

Auch bei der *Rheumatoiden Arthritis* wird im Tiermodell eine Translokation von HMGB1 aus dem Nukleus in das Zytoplasma und den Extrazellulärraum beobachtet, während dies bei gesunden Tieren nicht der Fall war [77].

Zudem hatte die Gabe von Anti-HMGB1-Antikörper einen Krankheits-verbessernden Effekt [78]. Extrazelluläres HMGB1 regt bei RA offenbar Makrophagen zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine an und induziert RANKL-abhängig die Bildung von Osteoklasten, die dann zu Gelenkdestruktionen führen [79, 80].

Beim *Diabetes mellitus Typ I* zeigten zwei Studien am Mausmodell eine Ausschüttung von HMGB1 aus apoptotischen Betazellen. Wie bei anderen Autoimmunerkrankungen auch, kann HMGB1 dendritische Zellen aktivieren und die Immunantwort gegen körpereigene Betazellen lenken. Die Gabe von Anti-HMGB1-Antikörpern konnten auch hier die Inzidenz reduzieren und den Krankheitsverlauf mildern [81, 82].

Als DAMP ist HMGB1 auch an *akuten systemischen Entzündungsvorgängen* beteiligt. Bei einer endotoxinbedingten Sepsis im Mausmodell waren die HMGB1-Werte im Serum deutlich erhöht und die zusätzliche Gabe von HMGB1 war tödlich, wohingegen die Gabe von Anti-HMGB1-Antikörpern zu einer Abschwächung der Krankheitserscheinungen führte [83]. Ebenso wurden im Tiermodell RAGE und TLR-9 als Aktivatoren der angeborenen Immunabwehr identifiziert, Blockierung von RAGE oder TLR-9 hatten dagegen jeweils protektive Effekte gegen septischen Schock [84, 85]. Auch bei sterilen Inflamationsreaktionen, z.B. beim „systemic inflammatory response syndrome“ (SIRS) oder nach einem Trauma ist HMGB1 involviert. So wurden u.a. erhöhte HMGB1-Blutwerte nach schwerem Trauma [86], Verbrennungstrauma [87] und postoperativ [88] nachgewiesen.

Auch bei *metabolischen Erkrankungen* wird der Einfluss von HMGB1 in der Pathogenese zunehmend erkannt. Beim Diabetes mellitus Typ II führt HMGB1 über RAGE-Aktivierung mittels oxidativen Stresses zur Inselzell-Apoptose und trägt so zum fortschreitenden Betazelluntergang bei [89]. Es wurden erhöhte HMGB1-Serumwerte bei DM II-Patienten berichtet und HMGB1 als unabhängiger Prognosemarker für koronare Herzkrankheit (KHK) in der diabetischen und der nicht-diabetischen Patientengruppe identifiziert [90]. HMGB1 wird offenbar vermehrt in aktivierten glatten Muskelzellen und arteriosklerotischen Gefäßplaques exprimiert; der chronische Entzündungsreiz bewirkt über RAGE-Aktivierung eine kontinuierliche HMGB1-Freisetzung aus Makrophagen, wodurch die Entzündung in einem positiven Feedback-Kreislauf verstärkt wird [91]. Auch beim Myokardinfarkt und nach Rekanalisation wird vermehrt HMGB1 freigesetzt und führt zur myokardialen Inflammation und Apoptose [92]. Sogar in neurodegenerativen Erkrankungen wie dem Morbus Alzheimer können erhöhte HMGB1-Werte im Gehirn gemessen werden, vor allem in der Umgebung der senilen Plaques,

wo es den Abbau des Amyloid- β Proteins behindert und so zum Fortschreiten der Erkrankung beiträgt [93].

Relevanz von HMGB1 und RAGE für die Pathophysiologie maligner Erkrankungen

Die Funktionen von HMGB1 in der Pathophysiologie von malignen Erkrankungen sind ebenso komplex und vielfältig; HMGB1 kann dabei sowohl fördernde und inhibierende Prozesse der Kanzerogenese unterstützen. Bei den fördernden Funktionen ist es bemerkenswert, dass HMGB1 in jedem der von Hanahan und Weinberg postulierten „Meilensteine der Tumorentwicklung“ eine Rolle spielt [94]. Dazu gehören unbegrenztes Replikationspotential, die Umgehung des programmierten Zelltodes (Apoptose), Unabhängigkeit von externen Wachstumssignalen, Unempfindlichkeit gegenüber Wachstumsinhibitoren sowie die Fähigkeit zu Angiogenese, Gewebsinfiltration und Metastasierung [reviewed in 56].

Unbegrenztes Replikationspotential

In eukaryotischen Zellen hängt das Replikationspotential von der Länge der Telomere ab, deren Länge mit jeder Mitose aufgrund der spezifischen Funktionsweise der DNA-Polymerasen abnimmt, bis keine Teilung mehr möglich ist. Darauf basieren der natürliche Alterungsprozess und die Gewebshomöostase. Tumorzellen können diese natürliche Replikationsbeschränkung überwinden, indem sie mit speziellen Telomerasen die Telomere wieder verlängern und damit nie die kritische Länge unterschreiten [95, 96]. HMGB1 als DNA-bindendes Chaperon interagiert auch mit Chromosomen in der Mitose, wie in vivo wurde, [97] und nachgewiesen mit einer Haarnadelstruktur auf einem Telomer wie explizit bei dem Parvovirus „minute virus of mice“ festgestellt wurde [98].

Umgehung des programmierten Zelltodes

Zellen mit erworbenem Genschaden werden bei einem intakten Regulationsmechanismus der Apoptose zugeführt, bevor sie sich teilen und zum Tumor heranwachsen können. Im Verlauf der Tumorentwicklung ist ungehemmtes Wachstum und Überwindung der Kontaktinhibition ebenfalls nur unter Ausschaltung der Apoptosemechanismen möglich. In vitro wurde gezeigt, dass HMGB1 BAX-induzierte Apoptose bei Hefezellen verhindert und einen protektiven Effekt gegen UV-induzierte Apoptose bei

Zellkulturen von Säugetieren hatte [99]. Allerdings ist hier der Redox-Status von HMGB1 von Bedeutung: nur die reduzierte Form konnte Tumorgewebe vor der Apoptose durch zytotoxische Agenzien bewahren, wohingegen die oxidierte Form sogar pro-apoptotische Effekte hat [100]. RAGE ist ebenfalls an einem anti-apoptotischen, p53-abhängigen Signalweg beteiligt und erzeugt daneben über NF κ B und MAPK („mitogen activated kinase“) Signalwege ein entzündliches Umfeld in der direkten Umgebung des Tumors [101].

Unabhängigkeit von externen Wachstumssignalen

Über membranständige Rezeptoren werden in gesunden Zellen externe Regulationssignale für das Zellwachstum in das Zellinnere weitergeleitet und dort in verschiedensten Signalwegen verarbeitet. Jedes Glied dieser Signalketten kann mutieren und eine kontinuierliche Reizweiterleitung bedingen, auch bei Fehlen der externen Wachstumsreize [94]. MAP-Kinasen und NF κ B sind Teil dieser intrazellulären Signaltransduktionsketten und können durch HMGB1 über RAGE oder TLR-2 und -4 aktiviert werden [101, 102] In Kolonkarzinomzellen wurde außerdem eine Aktivierung des Phosphatidylinositol (PIP3)/Akt Signalwegs durch HMGB1 nachgewiesen.

Unempfindlichkeit gegenüber Wachstumsinhibitoren

Eine Resistenz gegenüber externen Wachstumsinhibitoren führt zu einem bei Tumorzellen häufig anzutreffendem unreguliertem Zellzyklus. In vitro wurde eine Beschleunigung des Zellzyklus von MCF-7 Zellen beobachtet, wenn HMGB1-überexprimierende Zellen mit Östrogen stimuliert wurden. Allerdings führte die alleinige Überexpression von HMGB1 noch zu keiner Veränderung des Zellzyklus [103]. Überraschenderweise gibt es einige Berichte darüber, dass HMGB1 auch Zellzyklusarrest und Apoptose aktiviert, so z.B. über das Retinoblastoma Protein (Rb) [104] Auch hier könnte z.B. der Redox-Zustand von HMGB1 der Schlüssel zum Verständnis der gegensätzlichen Funktionen sein.

Angiogenese

Folge eines ungehemmten Wachstums von Tumorzellen ist eine lokale Hypoxie, die ein wirkungsvoller Stimulus für die Neubildung von Blutgefäßen ist. Wesentliche Mediatoren sind Angiogenesefaktoren wie der „vascular

endothelial growth factor“ (VEGF), die zunächst von Tumorzellen, später auch von Makrophagen freigesetzt werden. Unter diesen Faktoren findet sich auch HMGB1, das in vitro eine Sprossung von Endothelzellen und eine Zellmigration hervorrufen konnte [105] und einen positiven Feedback-Mechanismus unterhält [106]. Beim oralen Plattenepithelkarzinom fand sich zudem eine Korrelation von RAGE- und VEGF-Werten [107]. Da HMGB1 auch die Neubildung von Lymphgefäßen fördert, könnte es auch zur lymphogenen Metastasierung beitragen. So wurde beim oralen Plattenepithelkarzinom eine Korrelation der HMGB1-Werte mit der Dichte der Lymphgefäße und dem Lymphknoten-Status festgestellt [108].

Gewebsinfiltration und Metastasierung

Die Expression von RAGE korrelierte im kolorektalen und Magenkarzinom mit Zelltypen, Überexpression von HMGB1, Gewebsinfiltration und Metastasierung der Tumore [109, 110]. E-Selektin, selbst ein wichtiger Faktor bei der Metastasierung, scheint die zelluläre Expression von HMGB1 im kolorektalen Karzinom zu drosseln, führt andererseits aber zu vermehrter HMGB1-Freisetzung in das extrazelluläre Milieu, wo HMGB1 die vermehrte Expression von E-Selektin im Sinne eines positiven Feedback-Mechanismus fördert [111]. Darüber hinaus führt die Freisetzung von HMGB1 aus kolorektalen Tumorzellen zur Abnahme der Makrophagenzahlen in benachbarten, befallenen wie unbefallenen, Lymphknoten, was die Metastasierung in diesen Bereichen weiter begünstigt [112, 113]. Auch RAGE wurde im Fall von Pankreaskarzinomen mit der Fähigkeit zur Metastasierung assoziiert, wobei von drei Zelllinien mit verschieden hoher Metastasierungsneigung diejenige mit der niedrigsten RAGE-Expression die niedrigste Metastasierungsrate aufwies [114].

Entzündung und Tumor

Die zwei großen „Wirkungsgebiete“ von HMGB1, Entzündung und maligne Entartung, haben mehr gemeinsam, als man auf den ersten Blick annehmen möchte. Nicht umsonst werden seit kurzem drei Entzündungszustände zusätzlich zu den „klassischen“ Meilensteinen der Krebsentwicklung angeführt: ein entzündliches Mikroumfeld („microenvironment“), sowie die Fähigkeiten, vom Immunsystem unerkannt zu bleiben und eine Immunantwort zu unterdrücken [115]. HMGB1 reflektiert mit seinen gegensätzlichen Funktionen dabei die zwei Seiten des Immunsystems: einerseits führt ein chronisch entzündliches Umfeld zu Tumorprogression, andererseits führt eine

zielgerichtete Immunantwort zur wirksamen Bekämpfung der Tumorzellen.

Die proinflammatorischen Wirkungen von HMGB1 wurden bereits oben beschrieben: im *entzündlichen Mikroumfeld* des Tumors führt HMGB1 über Induktion von und Interaktion mit proinflammatorischen Zytokinen wie NFκB und IL-1-β [71, 116] zur Aufrechterhaltung des entzündlichen Milieus. Die dort befindlichen freien Radikale und Zytokine verursachen Zellschäden und Mutationen, die Ausgangspunkte für maligne Entartungen darstellen [34, 115]. Auch später fördern Entzündungsmediatoren das Tumorstadium, bis der Tumor schließlich selbst über Zytokinausschüttung mit positiven Rückwirkungen („Feedback“) die Entzündung unterhält. Es ist bekannt, dass maligne Tumoren oft in Gebieten chronischer Entzündung entstehen können, z.B. das HCC auf dem Boden einer chronischen Hepatitis. Eine grundsätzlich andere Situation liegt vor, wenn innerhalb eines kurzen Zeitraums eine große Menge an HMGB1 freigesetzt wird, wie es z.B. bei systemischer Chemotherapie mit folgendem massiven Zelluntergang der Fall ist. Dann unterstützt HMGB1 die Aktivierung von dendritischen Zellen, die zu effizienter Epitop-Präsentation und spezifischer T-Zell-Antwort führt [34, 64]. Über TLR-4 verhindert HMGB1 dabei den lysosomalen Abbau der aufgenommenen Bruchstücke apoptotischer Zellen, sodass die Epitope auf der Oberfläche für die T-Zell-Aktivierung zur Verfügung stehen [66]. Im Fall von Brustkrebspatienten führte ein Funktionsverlust des TLR-Rezeptors durch eine „loss of function“-Mutation zu einer schlechteren Prognose unter Anthrazyklintherapie. Daher wird HMGB1 eine wichtige Rolle in der Regulation der Chemosensitivität zugeschrieben [66, 67, 117]. Andererseits gibt es auch hier widersprüchliche Berichte, so z.B. dass eine steroidbedingte Überexpression von HMGB1 Zellkulturen eines Mammakarzinoms gegenüber einer Therapie mit Cisplatin sensibilisierte [118]. Die vollständige Erklärung dieser gegenläufigen Ergebnisse steht noch aus, allerdings ist ein Zusammenhang mit der Lokalisation von HMGB1 in verschiedenen Kompartimenten oder mit der Interaktion mit RAGE und weiteren Mediatoren anzunehmen [119]. Auch die Art der systemischen Chemotherapie hat einen Einfluss auf die HMGB1-Ausschüttung und die folgenden immunologischen Abläufe. So wurde beispielsweise bei Gabe von Oxaliplatin HMGB1 im Nukleus zurückgehalten, während es bei Alkylanzien und Taxanen vermehrt ausgeschüttet wurde [120, 121]. Zitvogel et al. legten kürzlich ein bemerkenswertes Erklärungsmodell vor, nach dem die Interaktionen zwischen untergehenden Zellen und ihrer Umgebung von einem „Kombinationscode“ abhängen. Je nach dem vorliegenden „Cocktail“ an Mediatoren und Zytokinen, ihrer räumlichen Zuordnung und der zeitlichen Abfolge ihrer Freisetzung würden demnach

unterschiedliche Immunantworten und Entzündungsreaktionen generiert. Das ist insofern plausibel, als die allermeisten Zelltodmediatoren ubiquitär in großer Zahl vorkommen, wie Calreticulin, ATP [122] oder HMGB1, deren bloße Anwesenheit jedoch kein hinreichender Anlass für eine Immunantwort sein kann. Erst die richtige zeitliche Abfolge („spatiotemporal sequence“) von freigesetzten Mediatoren im von der sterbenden Zelle generierten Umfeld mit dem richtigen „Cocktail“ an positiven und negativen Signalmolekülen führt zur Aktivierung von Immunzellen und deren Differenzierung. Das würde auch erklären, warum kleinste Konzentrationsänderungen und der Redoxstatus von HMGB1 so einen weitreichenden Einfluss auf die weiteren immunologischen Vorgänge haben können [123].

Eine Übersicht über die tumorfördernden Eigenschaften von HMGB1 zeigt Abbildung 2.

Immunogene Zelltodmarker als Biomarker im Blut

Freisetzung in die Blutbahn

HMGB1 kann aktiv sezerniert werden, so z.B. bei apoptotischen Zellen [37] oder aktivierten Zellen des angeborenen Immunsystems, oder passiv von nekrotischen oder beschädigten Zellen freigesetzt werden [124].

Durch akute Schädigung oder *Nekrose* verliert die Zellmembran ihre Schutzfunktion, sie wird durchlässig und kann intrazelluläre Bestandteile nicht mehr von der Diffusion nach extrazellulär zurückhalten. Die freigesetzten intrazellulären Substanzen interagieren mit den Zelloberflächen benachbarter Zellen und können so Entzündungsreaktionen auslösen [124, 125]. Diese passive Form der Freisetzung von HMGB1 wurde als „immunogen“ bezeichnet im Gegensatz zur immunologisch „stillen“ Apoptose, bei der durch die geordnete Selbsterstörung der Zelle keine HMGB1-Freisetzung detektiert werden konnte [124].

Allerdings konnte inzwischen bei verschiedensten Zelltypen auch eine Apoptose-abhängige Freisetzung von HMGB1 festgestellt werden, ohne dass Anzeichen einer Nekrose zu erkennen waren [37, 126]. Wurden Autophagie-Mechanismen in sterbenden Zellen blockiert, konnte auch eine Retention von HMGB1 beobachtet werden [127]. Wieder einmal scheint hier der Redoxstatus von HMGB1 eine entscheidende Rolle zu spielen: die reduzierte Form ist in der Lage, Autophagie zu fördern und damit die Chemoresistenz von Tumoren zu erhöhen, wohingegen die oxidierte Form proapoptotisch wirkt und die Wirksamkeit systemischer Chemotherapie erhöht [100]. Bei der Regulation des Redox-Status sind u.a. Variationen der intrazellulären Caspase-Aktivität und der Freisetzung von Sauerstoffradikalen von wesentlicher Bedeutung [128].

Während der Apoptose bleibt HMGB1 fest an die DNA-Stränge gebunden, sodass es aus apoptotischen Zellen

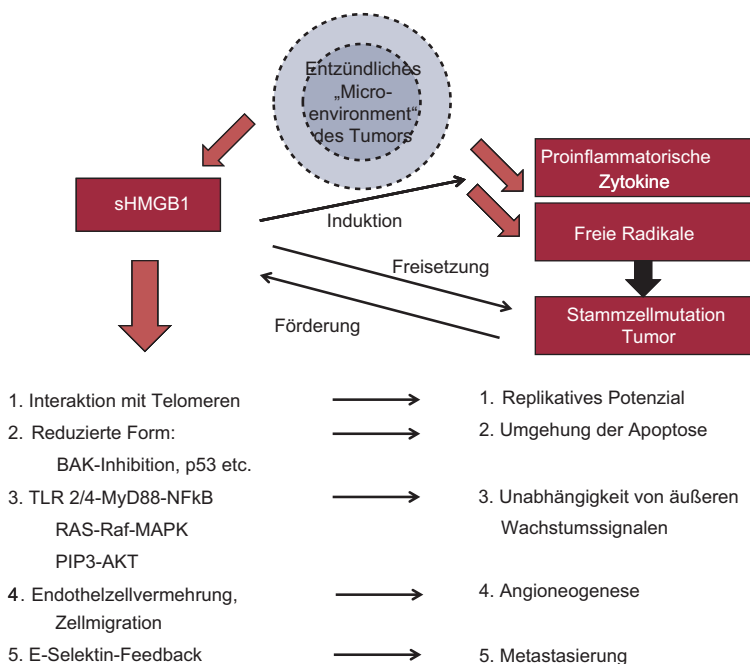


Abbildung 2 Tumorfördernde Funktionen von HMGB1. (Details siehe Text; modifiziert nach [57])

oft im Komplex mit Nukleosomen freigesetzt wird und mit diesen zusammen proinflammatorische Wirkungen über den TLR-2-Rezeptor entfalten kann [37, 68]. Apoptotische Zellen können auch Makrophagen zur Abgabe von HMGB1 in das extrazelluläre Milieu anregen [129]. Auf verschiedenste Stimuli, z.B. Endotoxine, TNF oder Interleukine wird ebenso HMGB1 aus Makrophagen und dendritischen Zellen aktiv freigesetzt [83]. Nicht zuletzt sind auch hypoxische, gestresste Zellen in der Lage, HMGB1 aktiv zu sezernieren. Dies konnte unter anderem für Hepatozyten [130] und Synovialgewebe *in vitro* bestätigt werden [131].

Zeitliche Abfolge der Freisetzung

In vitro Experimente mit Makrophagen zeigten eine HMGB1-Ausschüttung ca. 8 Stunden nach Endotoxingabe. Da HMGB1 über Induktion der Zytokinproduktion in einem positiven Feedback-System auch seine eigene Ausschüttung anregt, ist von diesem Zeitpunkt an eine kontinuierliche Ausschüttung anzunehmen [83, 132]. Unter Behandlung mit Alkylanzien und Taxanen kam es bei verschiedenen Tumorzellkulturen zur ersten messbaren Freisetzung nach 12 h, die Höchstkonzentration an extrazellulärem HMGB1 wurde allerdings erst nach 36–40 h erreicht. Das ebenfalls getestete Oxaliplatin führte zu keiner messbaren HMGB1-Freisetzung [120].

Im Mausmodell stiegen die extrazellulären HMGB1-Werte nach 8–32 h nach Gabe von Endotoxinen [83, 132] und bei Ratten stiegen die Werte ebenfalls ca. 12 h nach Induktion einer Pankreatitis an bis zu einem Höchstwert von 120 ng/mL nach 24 h. Danach blieb der HMGB1-Level für 36–72 h stabil erhöht bei ca. 60 ng/mL [133].

In Patienten nach mechanischem Trauma waren bereits innerhalb einer Stunde nach dem Ereignis etwa 30-fach erhöhte HMGB1-Werte messbar; nach einem weiteren Anstieg erreichten sie nach 2–6 h ihren Maximalwert und blieben anschließend für mehr als 5 Tage erhöht [134]. Auch bei Verbrennungstraumen waren die HMGB1-Werte bereits bei Aufnahme in das Krankenhaus erhöht und fielen über die folgenden 5 Tage nur langsam ab. HMGB1 korrelierte dabei mit der verbrannten Körperoberfläche und der Prognose [87].

Stabilität und Kinetik in der Blutbahn

Wie auch andere Proteine unterliegt HMGB1 im Blutkreislauf den Mechanismen des Abbaus und der Elimination. Eine Kenntnis dieser Mechanismen ist wichtig für das

Verständnis von Funktion und Regulation des Proteins, aber auch für die Einschätzung der zirkulierenden HMGB1-Werte v.a. in der Interpretation individueller Verläufe während und nach einer Therapie.

Leider gibt es zur *Stabilität* von HMGB1 im Blut bislang nur wenige Daten. In Pulse-Chase-Experimenten wurde eine Halbwertszeit von 52 h für HMGB1 berechnet [135]. Die Stabilität von HMGB1-DNA-Komplexen war abhängig von der Proteinkonzentration während der Bindungsphase und dissoziierte ab einer gewissen Proteinkonzentration nicht mehr spontan. Nach Ausbildung der Komplexe waren diese unabhängig von der umgebenden Proteinkonzentration stabil und lösten sich nur nach Zugabe von kompetitiven DNA-Fragmenten [136]. Auch die Bindung an andere Kofaktoren wie LPS, IL-1 β oder Anti-HMGB1-Antikörper wurde bereits beschrieben, ohne jedoch Angaben zu deren Auswirkungen auf die Stabilität von HMGB1 im Serum zu machen [137]. Die im Vergleich zu anderen Zytokinen wie z.B. TNF- α spät erreichte Höchstkonzentration könnte auf eine ausgeprägte Stabilität des Moleküls hinweisen, oder aber auf repetitive Freisetzung aufgrund von positiven Feedback-Mechanismen zurückzuführen sein [83, 132].

Zur *Kinetik* des freigesetzten, im Blut zirkulierenden HMGB1-Moleküls liegen bislang ebenfalls nur wenige Daten vor; sie dürfte allerdings mit jener von freien DNA-Fragmenten vergleichbar sein. Eine aktuelle Studie von Beiter et al. über den Konzentrationsverlauf zellfreier, nukleärer DNA und HMGB1 im Plasma von Probanden während und nach körperlicher Belastung auf Fahrradergometern berichtet von einem signifikanten Anstieg der HMGB1-Werte um mehr als das Dreifache des Ausgangswertes unmittelbar nach Belastung. 30 Minuten nach Ende der Belastung waren die Werte wieder auf dem Ausgangsniveau angelangt. Dieser schnelle Abfall weist auf im Blut vorliegende, effektive Eliminationsmechanismen für HMGB1 hin [138].

Abbau und Elimination aus der Blutbahn

Welche Faktoren maßgeblich für den Abbau von HMGB1 im Blutkreislauf sind, wurde bisher noch nicht umfassend untersucht. Ein Faktor, der die Elimination modifizieren kann, ist die Bildung von Auto-Antikörpern gegen HMGB1 z.B. im Rahmen von Autoimmun-Erkrankungen wie dem SLE [75, 139].

Auch wird ein Abbau von HMGB1 durch Serumproteasen beschrieben, z.B. durch Thrombin und Plasmin. Dabei führte die Spaltung von HMGB1 durch Thrombin oder den Thrombin-Thrombomodulin-Komplex zu einer

verminderten Immunogenität des Moleküls. Abbauprodukte von HMGB1 konnten so im Mausmodell nach Endotoxingabe und in Patienten nach disseminierter intravasaler Gerinnung im Blut gefunden werden [140]. In vitro beschleunigte HMGB1 auch die Plasminogenaktivierung durch Gewebsplasminogenaktivator t-PA um bis zu 46-fach, was auf einen negativen Feedback-Mechanismus in vivo hinweisen kann, mit dem HMGB1 seinen eigenen Abbau verstärkt [141].

Bei Schweinen mit induziertem akutem Leberversagen zeigten sich bereits nach 24 h erhöhte Werte von HMGB1, die nach künstlicher Leberunterstützung wieder abfielen. Ob dies allerdings der hepatischen Elimination von HMGB1 oder der induzierten Entzündungsreaktion zuzuschreiben ist, lässt sich daraus nicht ableiten [142].

Auch bei Patienten mit chronischem Nierenversagen fanden sich erhöhte HMGB1-Konzentrationen im Blut, die negativ mit der Glomerulären Filtrationsrate korrelierten. Auch hier ist kein direkter Schluss auf eine fehlende renale Elimination möglich, da HMGB1 auch mit Markern für Entzündung und Unterernährung korrelierte, zwei Zustände, die beide unabhängig zur Ausschüttung von HMGB1 führen können [143].

Nachweismöglichkeiten im Blut

Neben dem klassischen ELISA („enzyme-linked immunosorbent assay“) in Sandwich-Technik gibt es noch die Möglichkeit, HMGB1 mittels Western Blot oder EMSA („electromobility shift assay“) zu messen.

Die konventionelle ELISA-Methode ist gut geeignet für den Nachweis von HMGB1 in Lysaten von Zellkulturen oder Zellkultur-Überständen, allerdings wurden Serum- oder Plasmalevel niedriger gemessen als in Western Blot-Technik. Wahrscheinlich sind dafür maskierende Faktoren wie HMGB1-Antikörper, Lipopolysaccharide oder IL-1- β verantwortlich, die an HMGB1 binden und so die Erkennung des Moleküls im ELISA verhindern [144]. Eine Vorbehandlung mit Perchlorsäure führt zur Ablösung dieser Faktoren [137]. Ob die Bestimmung des gesamten HMGB1 oder des freien Anteils Unterschiede in der Bewertung klinischer Zustände ergibt, ist derzeit noch offen.

Beim Western Blot führt die Behandlung der Serum- und Plasmaproben mit SDS-PAGE zur Auflösung der maskierenden Proteinkomplexe und damit zu verlässlicheren Messergebnissen. Außerdem können beim Western Blot auch Background-Proteine dargestellt werden, was Rückschlüsse auf die Spezifität des Testes zulässt [137, 144, 145].

Allerdings ist die Durchführung in der Praxis zeit- und kostenaufwändiger als eine ELISA-Messung.

Beim „electrophoretic mobility shift assay“ (EMSA) macht man sich im Gegensatz zu ELISA und Western Blot die starke Bindung von HMGB1 an spezielle DNA-Sequenzen zu Nutze. HMGB1 bindet in den Proben an radioaktiv markierte DNA-Abschnitte und wird danach mittels Elektrophorese analysiert. Auch hier kann eine Minimierung von Background-Proteinen erreicht werden. Der Arbeitsaufwand ist mit dem Western Blot vergleichbar, allerdings ist die Verwendung radioaktiv markierter DNA-Abschnitte für die Routinediagnostik nachteilig [145].

Analog zu den Nachweisverfahren für HMGB1 gibt es auch für RAGE einen klassischen ELISA-Sandwichtest [146], sowie die Bestimmungsmöglichkeit mittels Western Blot und EMSA [147]. Die Vor- und Nachteile entsprechen dabei denen bei HMGB1.

Klinische Relevanz immunogener Zelltodmarker als Biomarker bei nicht-malignen Erkrankungen

Bei den oben beschriebenen traumatischen, autoimmunen, entzündlichen oder metabolischen Krankheitsbildern lassen die beteiligten Zelltodmarker Rückschlüsse auf die pathologischen Vorgänge im menschlichen Körper zu. Daher wurden bereits zu vielen dieser Erkrankungen immunogene Zelltodmarker als Biomarker zur Unterstützung der Diagnose, zur Abschätzung der Prognose und zur Verlaufsbeobachtung der Erkrankung untersucht. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse findet sich in Tabelle 1.

In einer Studie mit 115 Patienten mit einem akuten Polytrauma fanden sich bei Eintreffen in die Notaufnahme eines Traumazentrums signifikant höhere HMGB1- und sRAGE-Werte als bei 49 Kontrollpatienten mit unkomplizierten Schenkelhals- und Knöchelfrakturen. Dabei korrelierten beide Marker mit der Schwere des Polytraumas und des Hirnschadens. Zudem waren hohe initiale HMGB1, RAGE- und Nukleosomen-Werte bei Polytraumapatienten mit einer hohen Mortalität während der ersten Woche des Krankenhausaufenthaltes assoziiert [149].

Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen beschrieben auch Cohen et al. einen Anstieg der Plasmakonzentration von HMGB1 innerhalb der ersten Stunde nach schwerem Trauma. Dabei korrelierte die Höhe der Werte mit der Schwere der Verletzungen, den Komplikationen und der systemischen Entzündungsantwort [86]. Ob

Tabelle 1 Klinische Relevanz von immunogenen Zelltodmarkern.

Nicht-maligne Bedingung	n	Marker	Zeitrahmen	Korrelation mit Klinik	Korrelation mit Prognose	Literatur
Alter	190	sRAGE	Lebenszeit	Hohe sRAGE-Werte bei gesunden 100-jährigen; niedrige sRAGE-Werte bei Patienten mit frühem ACS		[148]
Trauma	115	HMGB1 sRAGE	bei Aufnahme ins KH	HMGB1 und sRAGE erhöht; positive Korrelation beider Marker mit Schwere des Polytraumas und Hirnschaden	HMGB1 und sRAGE niedriger bei Überlebenden	[149]
Trauma	168	HMGB1	30 min nach Aufnahme	HMGB1 erhöht; positive Korrelation mit Schwere der Verletzung	Niedriger bei Überlebenden	[86]
Sepsis	29	sRAGE	erste 24 h einer Sepsis	sRAGE erhöht gegenüber Gesunden	Niedrigere Werte bei Überlebenden nach 28 Tagen	[150]
Akute Pankreatitis	165	HMGB1 sRAGE	Tage 1–12 einer akuten Pankreatitis	Bei AP mit schwerem Organversagen sRAGE-Werte erhöht, HMGB1 nicht		[151]
Akute Pankreatitis	62	HMGB1 sRAGE, DNA	Aufnahme (0–48 h nach Ereignis)	HMGB1 und DNA bei schwerer AP erhöht, sRAGE bei Sepsis; negative Korrelation von HMGB1 und sRAGE.		[152]
SLE	37	HMGB1		HMGB1 erhöht gegenüber Gesunden; positive Korrelation mit Aktivitätsindex		[153]
Rheumatoide Arthritis	13	HMGB1		HMGB1 erhöht gegenüber Gesunden; positive Korrelation mit Aktivitätsindex (DAS-28)		[154]
KHK, Diabetes II	512	HMGB1 sRAGE esRAGE	Risiko-gruppen: DM II KHK	HMGB1 erhöht und esRAGE erniedrigt bei KHK in DM II-positive und negative Gruppe; sRAGE uneinheitlich	Hohes HMGB1 und niedriges esRAGE sind unabhängige Risikofaktor für Entstehung von KHK	[90]
Diabetes I	3100	sRAGE		Korrelation von sRAGE mit GFR, Albuminurie, BMI, Alter, Krankheitsdauer	Hohes sRAGE ist unabhängiger Faktor für kardiovaskuläre und Gesamtmortalität	[155]

(Tabelle 1 Fortsetzung)

Maligne Erkrankungen	n	Marker	Zeitrahmen	Korrelation mit Klinik/Verlauf/ Therapieansprechen	Korrelation mit Prognose	Literatur
NSCLC	145	HMGB1	Prä-/Post-OP	Präoperativ erhöht, ein Monat post-OP abfallend; Korrelation mit Tumorgröße- und stadium		[156]
NSCLC	40	HMGB1	Prätherapeut. erhöht	HMGB1 in Tumorpatienten erhöht		[157]
Magen- CA	227	HMGB1	Aktive Erkrankung	HMGB1 in Tumorpatienten erhöht; positive Korrelation mit Stadium	Hohes HMGB1 korreliert mit schlechter Prognose	[158]
HCC	166	HMGB1	Aktive Erkrankung	HMGB1 erhöht gegenüber nicht-malignen Lebererkrankungen; positive Korrelation mit Stadium, Größe und Differenzierung	Positive Korrelation mit prognostischem CLIP-Score	[159]
Zervix-CA	284	HMGB1	Aktive Erkrankung	HMGB1 höher bei Rezidiv als bei Ersterkrankung und Gesunden	Hohes HMGB1 korreliert mit kurzem Gesamtüberleben	[160, 161]
Kolorektales CA mit Lebermetastasen	49	HMGB1 sRAGE	Verlauf (0 h, 24 h, 48 h) während lokaler SIRT-Therapie	HMGB1 nach 24 h erhöht; sRAGE nach 24 h erniedrigt; hohe HMGB1-Werte (0 h, 24 h) korrelieren mit Progression unter Therapie	Hohe HMGB1-Werte (0 h, 24 h) korrelieren mit kurzem Gesamtüberleben	[161, 162]
HCC	50	HMGB1 sRAGE	Verlauf (0 h, 24 h) während lokaler TACE-Therapie	HMGB1 nach 24 h erhöht; sRAGE nach 24 h erniedrigt; niedrige sRAGE-Werte (0 h, 24 h) korrelieren mit Progression unter Therapie		[162]
Mamma- CA	51	HMGB1 sRAGE	Verlauf (0 d, 21 d, 84 d) während systemischer neoadjuv. Chemo-therapie	sRAGE (0 h) bei lokalem CA erniedrigt; niedriges sRAGE (0 h), hohes HMGB1 (0 h) und Kinetik korrelieren mit Therapieansprechen		[163]
Pankreas- CA	78	HMGB1 sRAGE Nukleosomen	Verlauf (0, 7, 14, 21, 28, 56 d) während systemischer palliativer Chemo-therapie	sRAGE (0 h) erniedrigt beim Pankreas-CA; niedriges sRAGE (d56) korreliert mit Progression unter Therapie	Niedrige sRAGE und hohe HMGB1 und Nukleosomen-Werte (verschiedene Zeitpunkte) korrelieren mit ungünstiger Prognose (Krankheitsfreies und Gesamtüberleben)	[164]

HMGB1 eine Schlüsselrolle für den ungünstigen Verlauf spielt oder nur durch die systemische Entzündungsreaktion ausgeschüttet wird, ist unklar [165], der Aussagewert einer Erhöhung könnte allerdings z.B. im Verlaufsmonitoring genutzt werden.

Erhöhte HMGB1-Konzentrationen finden sich zudem im Blut bei erregerbedingter Sepsis, vor allem bei Patienten mit schlechter Prognose [83], wohingegen das Auftreten von Auto-Antikörpern mit einem besseren Krankheitsverlauf assoziiert ist und eine protektive Funktion zu haben scheint [166].

In der Gruppe der Autoimmunerkrankungen ist sowohl bei SLE als auch bei Rheumatoider Arthritis die Konzentration von HMGB1 gegenüber gesunden Vergleichspersonen erhöht und korreliert positiv mit dem jeweiligen Aktivitätsindex [153, 154]. Nicht zuletzt führen auch die erwähnten metabolischen Erkrankungen zu deutlich gegenüber dem Normalwert erhöhten HMGB1-Konzentrationen, was in mehreren Studien zu Diabetes [90, 167], koronarer Herzkrankheit [90, 168], Myokardinfarkt [169, 170] und Schlaganfall [169] belegt werden konnte.

In der Studie zu koronarer Herzkrankheit und Diabetes zeigte sich interessanterweise die Serumkonzentration von esRAGE signifikant bei KHK-Patienten in der Diabetes-positiven und negativen Gruppe (sRAGE nur in der Diabetes-negativen Gruppe) erniedrigt, was auf eine protektive Funktion von (e)sRAGE hinweisen könnte [90]. Diese These stützt eine weitere Studie, die über signifikant höhere sRAGE Plasmawerte in gesunden 100-Jährigen im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen mittleren Alters berichtet; Patienten mit einem frühzeitigen Myokardinfarkt hatten hingegen deutlich erniedrigte sRAGE-Werte [148]. Auch zeigten sich erniedrigte sRAGE-Werte bei chronisch entzündlichen Erkrankungen, Atherosklerose, Diabetes, Nierenversagen und im Verlauf des Alterungsprozesses. [reviewed in 171].

Allerdings gibt es auch Studien, die erhöhte sRAGE-Werte mit einem höheren Mortalitätsrisiko bei Diabetes Typ I in Verbindung bringen [155]. Außerdem sind bei akuten entzündlichen Erkrankungen wie Sepsis, akute Pankreatitis oder unmittelbar nach einem Trauma die sRAGE-Werte z.T. stark erhöht und korrelieren mit einer ungünstigen Prognose [86, 149–152].

Die Vielzahl der möglichen Auslöser für eine HMGB1- oder eine sRAGE-Freisetzung macht gerade bei multimorbiden Patienten eine diagnostische Zuordnung zu einem spezifischen Krankheitsbild schwer und sollte auch bei der Anwendung von immunogenen Zelltodmarkern zur Verlaufskontrolle etc. immer mit in Betracht gezogen werden.

Klinische Relevanz von immunogenen Zelltodmarkern als Biomarker bei Tumorerkrankungen

Während eine Reihe an Studien die funktionellen Aspekte von HMGB1 und RAGE beleuchtet, untersuchten nur wenige die Rolle von im Serum oder Plasma zirkulierendem HMGB1 und sRAGE für die Diagnostik, Prognoseabschätzung und Verlaufsbeobachtung bei malignen Erkrankungen.

Shang et al. berichteten von deutlich erhöhten HMGB1-Konzentrationen (Mittelwert $76,1 \pm 37,0$ ng/mL) bei 145 Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC) im Vergleich zu 49 gesunden Kontrollpersonen ($7,7 \pm 6,1$ ng/mL) und 77 Patienten mit chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD; $39,8 \pm 10,8$ ng/mL) als wichtiger Differenzialdiagnose zum Lungenkarzinom. Die HMGB1-Werte korrelierten mit dem Tumorstadium und der Tumorgöße und fielen nach Tumoresektion signifikant ab; außerdem konnte zwischen lokalen Tumormanifestationen und Fernmetastasen unterschieden werden [156].

Eine kleinere Studie an 40 Patienten mit NSCLC fand ebenso erhöhte prätherapeutische HMGB1- und VEGF-Werte im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen, allerdings keinerlei Korrelation mit der Prognose oder eine Differenzierung zwischen den Stadien IIIb und IV [157].

In einer Studie zu prätherapeutischen HMGB1-Werten bei Patienten mit Magenkrebs wurden Serumproben von 227 Patienten untersucht, die sich einer Gastroskopie unterzogen. Die Serumwerte von HMGB1 differierten signifikant zwischen den fünf untersuchten Subgruppen und stiegen mit dem Stadium der Tumorentwicklung von „nicht-maligne“ (z.B. Ulzera), über Hochrisiko-Patienten (z.B. Adenome), Magenfrühkarzinom, lokal fortgeschrittenes Magenkarzinom bis hin zum metastasierten Magenkarzinom kontinuierlich an. Außerdem konnte auch hier ein Zusammenhang von HMGB1 mit Tumorgöße, Lymphknotenstatus und schlechter Prognose, jedoch nicht mit Perineuralscheiden- oder Lymphgefäßinvasion gezeigt werden. Interessanterweise stellte sich HMGB1 dabei als überlegen gegenüber dem etablierten Tumormarker CEA heraus [158].

Auch in 166 Patienten mit hepatozellulärem Karzinom wurden erhöhte Serumwerte von HMGB1 ($84,2 \pm 50,4$ ng/mL) im Vergleich zu 62 Patienten mit Leberzirrhose ($40,2 \pm 11,6$ ng/mL), 51 Patienten mit chronischer Hepatitis ($39,8 \pm 10,5$ ng/mL) und 56 gesunden Kontrollpersonen ($7,0 \pm 5,9$ ng/mL) gefunden. Hier korrelierte HMGB1 ebenfalls mit Tumorgöße, -stadium, -differenzierung und den α -Fetoprotein-Werten (AFP) [159].

Sheng et al. untersuchten die Serumwerte von HMGB1, CYFRA 21-1, SCC und CEA bei Patientinnen mit Plattenepithelkarzinomen der Zervix. Erhöhte Mittelwerte von HMGB1 und auch der anderen Biomarker wurden insbesondere in der Gruppe der 112 Patientinnen mit Tumorrezidiv gemessen (50,8 ng/mL), im Vergleich zu 172 rezidivfreien Karzinom-Patientinnen (15,1 ng/mL) und 128 gesunden Kontrollpersonen (7,6 ng/mL). Unter allen Biomarkern zeigte HMGB1 in den ROC-Kurven die beste Diskriminationsfähigkeit. Eine Kombination von HMGB1 mit SCC und CYFRA 21-1 sowie serielle Verlaufsmessungen verbesserten zudem Sensitivität und Spezifität. Bei den Rezidiv-Fällen korrelierten die HMGB1-Werte auch mit dem krankheitsfreien Intervall und der Gesamtüberlebenszeit [160].

Immunogene Zelltodmarker in der Beurteilung des Therapieansprechens und der Prognose

Ausgehend von den viel versprechenden Ergebnissen der Studien über den zirkulierenden Zelltodmarker Nukleosomen für die frühzeitige Beurteilung des Ansprechens zytotoxischer Therapien und der Prognose v.a. bei Patienten mit fortgeschrittenen soliden Karzinomen [siehe oben, 17, 167] und den Berichten über die gemeinsame Freisetzung von Nukleosomen und HMGB1 bei spät-apoptotischen Zelltodprozessen, lag es nahe, auch die Kinetik der immunogenen Zelltodmarker HMGB1 und sRAGE in dieser Fragestellung zu untersuchen.

Als Grundlage für die klinisch-diagnostischen Studien wurden die ELISA-Tests für HMGB1 und sRAGE hinsichtlich ihrer methodischen Qualität und möglicher präanalytischer Einflussfaktoren getestet [146, 172]. Hierbei ergaben sich für beide manuelle Tests gute Intra- und Interassay-Impräzisionen mit Variationskoeffizienten unter 15% sowie gute Linearitätsergebnisse in den Verdünnungsreihen. Für sRAGE fanden sich vergleichbare Wertelagen in Serum und Plasmaproben, während für HMGB1 im Plasma deutlich niedrigere Signale als im Serum gemessen wurden. Für die Serumproben wurde als präanalytisch wesentlicher Aspekt die Notwendigkeit einer zeitnahen Zentrifugation der Proben nach Blutentnahme v.a. hinsichtlich der HMGB1-Werte identifiziert. Nach Zentrifugation waren die Werte in den Proben stabil, selbst wenn sie bis zu eine Woche im Kühlschrank oder bei Raumtemperatur aufbewahrt wurden. Mehrmaliges Auftauen und Einfrieren hatte ebenfalls keine Auswirkungen auf die HMGB1- und sRAGE-Werte. Anhand einer gesunden Kontrollgruppe wurde für HMGB1 ein Median

von 1,3 ng/mL und eine 95% Perzentile von 4,1 ng/mL errechnet, für sRAGE lag der Median bei 1,1 ng/mL und die 90% Perzentilen bei 0,52 und 1,49 ng/mL [146, 172].

In den anschließenden klinischen Studien wurden HMGB1 und sRAGE in verschiedenen Settings bei Patienten mit fortgeschrittener Tumorerkrankung, die sich einer lokalen oder systemischen Therapie unterzogen, untersucht. Parallel hierzu wurden klinische Charakteristika, etablierte Tumor-assoziierte Biomarker wie auch weitere Organ-, Inflammations- und Zelltod-assoziierte Marker hinzugezogen, um den spezifischen Nutzen der neuen Marker für die Abschätzung der Prognose und des Therapieansprechens herauszuarbeiten.

Im Rahmen der lokalen Therapien wurden 49 Patienten mit Leber-Metastasen eines kolorektalen Karzinoms, die eine Selektive Interne Radio-Therapie (SIRT) erhielten [161, 173], sowie 50 Patienten mit einem primären Leberzellkarzinom, die mit einer Trans-Arteriellen Chemo-Embolisation (TACE) behandelt wurden, untersucht [162, 174]. Grundlage dieser Therapien ist die doppelte Gefäßversorgung der Leber: Gesundes Lebergewebe wird dabei überwiegend durch die Portalvene, Tumorgewebe durch die Leberarterie versorgt. Werden nun hohe Dosen radioaktiv beladener Mikrosphären (SIRT) oder zytotoxischer Substanzen (TACE) in die Äste der Leberarterie eingebracht, wird vor allem Tumorgewebe geschädigt während gesundes Gewebe nur begrenzter Toxizität ausgesetzt ist. Da starke lokale Therapieeffekte erwartet wurden, wurden die Serum-Biomarker bei den Patienten vor sowie 24 und 48 Stunden nach Verabreichung der Therapie gemessen und mit dem radiologischen Ansprechen der Therapie nach einem (TACE) oder drei Monaten (SIRT) und mit dem Gesamtüberleben korreliert.

In der SIRT-Studie waren bereits vor Therapiebeginn die Serumwerte von HMGB1 und Nukleosomen erhöht, wohingegen die Werte von sRAGE niedriger waren als die der gesunden Kontrollpersonen. Einen Tag (24 h) nach dem Eingriff waren HMGB1- und Nukleosomen-Werte nochmals deutlich angestiegen und die sRAGE-Werte weiter abgefallen. Interessanterweise korrelierten die 24 h-Werte von HMGB1 und Nukleosomen hochsignifikant, was die Hypothese der gleichzeitigen oder kombinierten Freisetzung unterstützte. Hinsichtlich des Therapieansprechens, welches durch PET-CT oder MRT nach drei Monaten objektiviert wurde, waren HMGB1 nach 0 h und 24 h sowie Nukleosomen nach 24 h in der Gruppe der Patienten mit einer Tumorprogression im Vergleich zu jenen mit stabiler Erkrankung deutlich erhöht. Die prätherapeutischen Werte von HMGB1 lagen bei 40% der progressiven Patienten sogar über 10 ng/mL, während kein Patient der nicht-progressiven Gruppe solch hohen Werte erreichte.

Damit wäre anhand der prätherapeutischen HMGB1-Werte eine sehr frühe, spezifische Unterscheidung der beiden Subgruppen möglich. In ähnlicher Weise waren hohe Basis- und 24 h-Werte von HMGB1 außerdem mit einem ungünstigen Langzeitüberleben assoziiert. In der multivariaten Analyse mit Tumor-, Leber- und Inflammationsmarkern wurden HMGB1 und CRP als unabhängige prognostische Parameter bestätigt [161, 173].

Auch in der TACE-Studie waren die Serumkonzentrationen von Nukleosomen und HMGB1 24 h nach der Behandlung signifikant erhöht, während die RAGE-Werte erniedrigt waren. Wiederum wurden höhere Nukleosomen-Werte (24 h) bei Patienten mit einer Progression unter Therapie gefunden im Vergleich zu den Progressions-freien Patienten; zudem wurden Nukleosomen in der multivariaten Analyse als unabhängige prädiktive Marker für das Therapieansprechen bestätigt [174]. Trotz der Ähnlichkeit der Verfahren bei Radio- und Chemoembolisation zeigte HMGB1 hier keine prädiktive Relevanz. Allerdings waren die sRAGE-Werte sowohl vor als auch 24 h nach Verabreichung der Therapie in Patienten mit progressiver Erkrankung signifikant niedriger als bei nicht-progressiver Erkrankung [162, 174].

Auch in zwei weiteren Studien an 51 Patienten mit lokalisiertem Mammakarzinom, die präoperativ eine neoadjuvante Chemotherapie erhielten [163], sowie an 78 Patienten mit einem fortgeschrittenen Pankreaskarzinom, die eine palliative Chemotherapie erhielten [164], wurden die immunogenen Biomarker im Verlauf der systemischen zytotoxischen Therapien untersucht und hinsichtlich ihrer Aussagekraft für die Beurteilung des Therapieansprechens oder der Prognose geprüft. Bei diesen Ansätzen waren die Intervalle der Messungen größer, so dass der unmittelbare Therapieeffekt nicht abgebildet wurde.

Nichtsdestoweniger bestätigte sich in der neoadjuvanten Studie mit Mammakarzinom-Patientinnen die Tendenz, dass prätherapeutisch hohe HMGB1- und niedrige sRAGE-Werte mit einem unzureichenden Therapieansprechen korrelieren. Ferner erwies sich auch die Kinetik von HMGB1 als potentiell relevanter Marker [163]. Dies ist umso bemerkenswerter, als die etablierten Tumormarker CEA und CA 15-3 für diese Fragestellung keine Aussagekraft hatten.

Auch in der Studie mit Patienten mit einem Pankreaskarzinom, bei denen die Biomarker in wöchentlichem Abstand erhoben wurden, waren bereits die

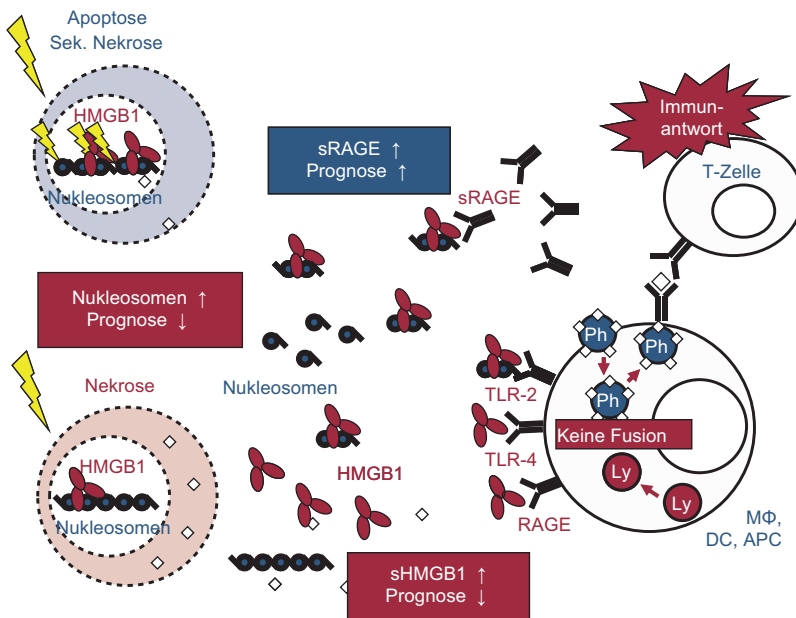


Abbildung 3 Übersicht über die Funktionen von HMGB1 und RAGE.

HMGB1 wird während Nekrose sowie in Kombination mit Nukleosomen während der Apoptose/sekundären Nekrose in den Extrazellulärraum freigesetzt. An Makrophagen (MΦ), dendritischen (DC) und Antigen-präsentierenden Zellen (APC) bindet HMGB1 an verschiedene Rezeptoren wie TLR-2 und 4 oder RAGE und induziert in diesen Zellen u.a. eine Kreuzpräsentation der phagozytierten Antigene der degradierten Zelle an ihrer Zellmembran, wodurch eine spezifische T-Zell Antwort getriggert wird. Hierbei kann die chronische und akute Immunaktivierung die Tumorentstehung unterschiedliche beeinflussen (siehe Text). Lösliches sRAGE wird durch alternatives Splicing gebildet oder von der Zelloberfläche abgeschilfert und kann durch Bindung an freies HMGB1 möglicherweise als Decoy-Rezeptor wirken. Als Biomarker im Blut sind hohe Konzentrationen von HMGB1 und Nukleosomen häufig mit einer ungünstigen Prognose, hohe Werte des löslichen sRAGE jedoch mit einer günstigen Prognose der Patienten assoziiert (modifiziert nach [176]).

prätherapeutischen sRAGE-Werte im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen signifikant erniedrigt ($p=0,0001$). Auch die DNase-Aktivität war bei den Patienten niedriger als bei der Kontrollgruppe ($p<0,0001$). Hinsichtlich des Therapieansprechens wiesen die 42 Patienten mit einer radiologisch progredienten Erkrankung signifikant niedrigere sRAGE-Werte zum Staging-Zeitpunkt nach 2 Monaten auf als die 26 Patienten mit einem stabilen Krankheitszustand [164].

Bezüglich der Prognose der Patienten korrelierte das Tertil der höchsten prätherapeutischen RAGE-Werte ($>0,85$ ng/mL) mit einem signifikant verbesserten medianem Überleben (11,4 vs. 6,5 Monate) und einer verlängerten Zeit bis zur Krankheitsprogression (6,1 vs. 3,4 Monate). Dagegen war das Tertil mit den höchsten prätherapeutischen HMGB1-Werten (3,3 ng/mL) mit einem kürzeren medianen Überleben assoziiert (5,8 vs. 8,4 Monate); weiter korrelierten hohe Nukleosomen-Werte an fast allen untersuchten Tagen (7, 14, 21, 28 und 56 nach Therapiebeginn) mit einer signifikant kürzeren Zeit bis zur Tumorprogression [164]. Wenngleich die onkologischen Biomarker CA 19-9, CEA und CYFRA 21-1 in der gleichen Patientenkohorte eine ebenfalls beeindruckende prognostische Wertigkeit zeigten [175], sind die neuen immunogenen Biomarker für die Fragestellungen des Therapiemonitorings und der Prognoseabschätzung viel versprechende zusätzliche Parameter.

Perspektiven

Immunogene Zelltodmarker wie HMGB1 und sRAGE sind in viele akute und chronische pathophysiologische

Prozesse involviert und scheinen auch bei Tumorerkrankungen eine wichtige immunmodulierende Funktion zu haben. Diese betrifft die Aufrechterhaltung des entzündlichen Tumor-Mikroumfelds, die Förderung von Tumorwachstum, Invasivität, Angiogenese und Metastasierung. Als im Blut zirkulierende Biomarker sind sie aufgrund der fehlenden Organ- und Tumorspezifität nicht zur Früh- oder Differenzial-Diagnose von Tumorerkrankungen geeignet. Jedoch lassen bei Patienten mit soliden Tumoren die häufig bereits schon prätherapeutisch erhöhten Werte von HMGB1 und Nukleosomen und die erniedrigten sRAGE-Werte Rückschlüsse über das spätere Therapieansprechen und die Prognose der Patienten zu (Abbildung 3). Ferner können die Veränderungen der Serumkonzentrationen bereits in den ersten Tagen nach Verabreichung der Therapie oder zu späteren Zeitpunkten während der Therapie für diese Fragestellungen genutzt werden.

Die Einbeziehung dieser immunogenen Biomarker in zukünftigen Therapiestudien wird zeigen, in welchen klinischen Settings sie sich als diagnostisch besonders wertvoll im Sinne einer Ergänzung oder Überlegenheit zu den derzeit verfügbaren Biomarkern erweisen. Es bleibt zudem abzuwarten, ob spezifischere Assays gegen oxidierte/reduzierte HMGB1-Formen und Nukleosomen mit tumortypischen Histonvarianten und -modifikationen die klinische Aussagekraft weiter verbessern können.

Interessenkonflikt: Die Autoren erklären, dass keine wirtschaftlichen oder persönlichen Interessenkonflikte bestehen.

Literatur

1. Stieber P, Heinemann V. Sinnvoller Einsatz von Tumormarkern/ Sensible use of tumor markers. *LaboratoriumsMedizin* 2008;32.5:339–60.
2. Sturgeon CM, Duffy MJ, Hofmann BR, Lamerz R, Fritsche HA, Gaarenstroom K, et al. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines for use of tumor markers in liver, bladder, cervical, and gastric cancers. *Clin Chem* 2010;56:e1–48.
3. Beachy SH, Repasky EA. Using extracellular biomarkers for monitoring efficacy of therapeutics in cancer patients: an update. *Cancer Immunol Immunother* 2008;57:759–75.
4. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Guidelines. Available at: http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp. Accessed: 14.01.2013.
5. Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:205–16.
6. Brambs HJ, Claussen CD. Pancreatic and ampullary carcinoma. Ultrasound, computed tomography, magnetic resonance imaging and angiography. *Endoscopy* 1993;25:58–68.
7. Gress F, Gottlieb K, Sherman S, Lehman G. Endoscopic ultrasonography-guided fine-needle aspiration biopsy of suspected pancreatic cancer. *Ann Intern Med* 2001;134:459–64.
8. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* 2009;45:228–47.
9. D'Ipollito G, Torres LR, Saito Filho CF, Ferreira RM. CT and MRI in monitoring response: state-of-the-art and future developments. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2011;55:603–19.

10. Li SP, Padhani AR. Tumor response assessments with diffusion and perfusion MRI. *J Magn Reson Imaging* 2012;35:745–63.
11. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 2012;366:883–92.
12. Stieber P, Holdenrieder S. Lung cancer biomarkers-Where we are and what we need. *Cancer Biomark* 2010;6:221–4.
13. Haas M, Heinemann V, Kullmann F, Laubender RP, Klose C, Bruns CJ, et al. Prognostic value of CA 19-9, CEA, CRP, LDH and bilirubin levels in locally advanced and metastatic pancreatic cancer: results from a multicenter, pooled analysis of patients receiving palliative chemotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol* 2013 [published online].
14. Boeck S, Stieber P, Holdenrieder S, Wilkowski R, Heinemann V. Prognostic and therapeutic significance of carbohydrate antigen 19-9 as tumor marker in patients with pancreatic cancer. *Oncology* 2006;70:255–64.
15. Kulasingam V, Diamandis EP. Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies. *Nat Clin Pract Oncol* 2008;5:588–99.
16. Holdenrieder S, Stieber P. Clinical use of circulating nucleosomes. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2009;46:1–24.
17. Holdenrieder S, Nagel D, Schalhorn A, Heinemann V, Wilkowski R, von Pawel J, et al. Clinical relevance of circulating nucleosomes in cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1137:180–9.
18. Holdenrieder S, Stief J, Bergner A, Gamarra F, Mitlewski A, Nagel D, et al. Nucleosomes indicate the in vitro radiosensitivity of irradiated bronchoepithelial and lung cancer cells. *Tumor Biol* 2004;25:321–6.
19. Kumar S, Guleria R, Singh V, Bharti AC, Mohan A, Das BC. Plasma nucleosome levels might predict response to therapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2010;11:36–44.
20. Holdenrieder S, Stieber P, von Pawel J, Raith H, Nagel D, Feldmann K, et al. Circulating nucleosomes predict the response to chemotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:5981–7.
21. Holdenrieder S, von Pawel J, Dankelmann E, Duell T, Faderl B, Markus A, et al. Nucleosomes, ProGRP, NSE, CYFRA 21-1, and CEA in monitoring first-line chemotherapy of small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:7813–21.
22. Holdenrieder S, von Pawel J, Dankelmann E, Duell T, Faderl B, Markus A, et al. Nucleosomes and CYFRA 21-1 indicate tumor response after one cycle of chemotherapy in recurrent non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2009;63:128–35.
23. Holdenrieder S, Stieber P, J VONP, Raith H, Nagel D, Feldmann K, et al. Early and specific prediction of the therapeutic efficacy in non-small cell lung cancer patients by nucleosomal DNA and cytokeratin-19 fragments. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1075:244–57.
24. Kremer A, Wilkowski R, Holdenrieder S, Nagel D, Stieber P, Seidel D. Nucleosomes in pancreatic cancer patients during radiochemotherapy. *Tumor Biol* 2005;26:44–9.
25. Kremer A, Holdenrieder S, Stieber P, Wilkowski R, Nagel D, Seidel D. Nucleosomes in colorectal cancer patients during radiochemotherapy. *Tumor Biol* 2006;27:235–42.
26. Mueller S, Holdenrieder S, Stieber P, Haferlach T, Schalhorn A, Braess J, et al. Early prediction of therapy response in patients with acute myeloid leukemia by nucleosomal DNA fragments. *BMC Cancer* 2006;6:143.
27. Zeerleder S, Zwart B, Willemin WA, Aarden LA, Groeneveld AB, Caliezi C, et al. Elevated nucleosome levels in systemic inflammation and sepsis. *Crit Care Med* 2003;31:1947–51.
28. Lo YM, Rainer TH, Chan LY, Hjelm NM, Cocks RA. Plasma DNA as a prognostic marker in trauma patients. *Clin Chem* 2000;46:319–23.
29. Geiger S, Holdenrieder S, Stieber P, Hamann GF, Bruening R, Ma J, et al. Nucleosomes in serum of patients with early cerebral stroke. *Cerebrovasc Dis* 2006;21:32–7.
30. Holdenrieder S, Eichhorn P, Beuers U, Samtleben W, Schoenermarck U, Zachoval R, et al. Nucleosomal DNA fragments in autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1075:318–27.
31. Koutouzov S, Jeronimo AL, Campos H, Amoura Z. Nucleosomes in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am* 2004;30:529–58, ix.
32. Sallai K, Nagy E, Derfalvy B, Muzes G, Gergely P. Antinucleosome antibodies and decreased deoxyribonuclease activity in sera of patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005;12:56–9.
33. Krynetskaia N, Xie H, Vucetic S, Obradovic Z, Krynetskiy E. High mobility group protein B1 is an activator of apoptotic response to antimetabolite drugs. *Mol Pharmacol* 2008;73:260–9.
34. Campana L, Bosurgi L, Rovere-Querini P. HMGB1: a two-headed signal regulating tumor progression and immunity. *Curr Opin Immunol* 2008;20:518–23.
35. Chaput N, De Botton S, Obeid M, Apetoh L, Ghiringhelli F, Panaretakis T, et al. Molecular determinants of immunogenic cell death: surface exposure of calreticulin makes the difference. *J Mol Med* 2007;85:1069–76.
36. Kepp O, Galluzzi L, Martins I, Schlemmer F, Adjemian S, Michaud M, et al. Molecular determinants of immunogenic cell death elicited by anticancer chemotherapy. *Cancer Metastasis Rev* 2011;30:61–9.
37. Bell CW, Jiang W, Reich CF 3rd, Pisetsky DS. The extracellular release of HMGB1 during apoptotic cell death. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;291:C1318–25.
38. Goodwin GH, Johns EW. The isolation and purification of the high mobility group (HMG) nonhistone chromosomal proteins. *Methods Cell Biol* 1977;16:257–67.
39. Saito K, Kikuchi T, Yoshida M. The mechanism of sequence non-specific DNA binding of HMG1/2-box B in HMG1 with DNA. *Protein Eng* 1999;12:235–42.
40. Tian J, Avalos AM, Mao SY, Chen B, Senthil K, Wu H, et al. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat Immunol* 2007;8:487–96.
41. Yang H, Ochani M, Li J, Qiang X, Tanovic M, Harris HE, et al. Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:296–301.
42. Bustin M. Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins. *Mol Cell Biol* 1999;19:5237–46.
43. Ferrari S, Finelli P, Rocchi M, Bianchi ME. The active gene that encodes human high mobility group 1 protein (HMG1) contains introns and maps to chromosome 13. *Genomics* 1996;35:367–71.
44. Kornblit B, Munthe-Fog L, Petersen SL, Madsen HO, Vindelov L, Garred P. The genetic variation of the human HMGB1 gene. *Tissue Antigens* 2007;70:151–6.

45. Kawase T, Sato K, Ueda T, Yoshida M. Distinct domains in HMGB1 are involved in specific intramolecular and nucleosomal interactions. *Biochem* 2008;47:13991–6.
46. Pogna EA, Clayton AL, Mahadevan LC. Signalling to chromatin through post-translational modifications of HMGN. *Biochim Biophys Acta* 2010;1799:93–100.
47. Uramoto H, Izumi H, Nagatani G, Ohmori H, Nagasue N, Ise T, et al. Physical interaction of tumour suppressor p53/p73 with CCAAT-binding transcription factor 2 (CTF2) and differential regulation of human high-mobility group 1 (HMG1) gene expression. *Biochem J* 2003;371:301–10.
48. Rothermund K, Rogulski K, Fernandes E, Whiting A, Sedivy J, Pu L, et al. C-Myc-independent restoration of multiple phenotypes by two C-Myc target genes with overlapping functions. *Cancer Res* 2005;65:2097–107.
49. Muller S, Ronfani L, Bianchi ME. Regulated expression and subcellular localization of HMGB1, a chromatin protein with a cytokine function. *J Intern Med* 2004;255:332–43.
50. Seyedin SM, Pehrson JR, Cole RD. Loss of chromosomal high mobility group proteins HMG1 and HMG2 when mouse neuroblastoma and friend erythroleukemia cells become committed to differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:5988–92.
51. Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, Herbst R, Coyle AJ. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu Rev Immunol* 2010;28:367–88.
52. Yonekura H, Yamamoto Y, Sakurai S, Petrova RG, Abedin MJ, Li H, et al. Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury. *Biochem J* 2003;370:1097–109.
53. Raucci A, Cugusi S, Antonelli A, Barabino SM, Monti L, Bierhaus A, et al. A soluble form of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is produced by proteolytic cleavage of the membrane-bound form by the sheddase a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *Faseb J* 2008;22:3716–27.
54. Geroldi D, Falcone C, Emanuele E. Soluble receptor for advanced glycation end products: from disease marker to potential therapeutic target. *Curr Med Chem* 2006;13:1971–8.
55. Fukami A, Adachi H, Yamagishi S, Matsui T, Ueda S, Nakamura K, et al. Factors associated with serum high mobility group box 1 (HMGB1) levels in a general population. *Metabolism* 2009;58:1688–93.
56. Tang D, Kang R, Zeh HJ 3rd, Lotze MT. High-mobility group box 1 and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2010;1799:131–40.
57. Wittwer C, Hartmann G, Holdenrieder S. Soluble HMGB1 as clinical biomarker. *J Immunol* 2013;submitted.
58. Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M, Wendt T, Chavakis T, Arnold B, et al. Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Mol Med* 2005;83:876–86.
59. Sparvero LJ, Asafu-Adjei D, Kang R, Tang D, Amin N, Im J, et al. RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts), RAGE ligands, and their role in cancer and inflammation. *J Transl Med* 2009;7:17.
60. Liu R, Mori S, Wake H, Zhang J, Liu K, Izushi Y, et al. Establishment of in vitro binding assay of high mobility group box-1 and S100A12 to receptor for advanced glycation endproducts:Heparin's effect on binding. *Acta Med Okayama* 2009;63:203–11.
61. Gong H, Zuliani P, Komuravelli A, Faeder JR, Clarke EM. Analysis and verification of the HMGB1 signaling pathway. *BMC Bioinformatics* 2010;11(Suppl 7):S10.
62. Hudson BI, Kalea AZ, Del Mar Arriero M, Harja E, Boulanger E, D'Agati V, et al. Interaction of the RAGE cytoplasmic domain with diaphanous-1 is required for ligand-stimulated cellular migration through activation of Rac1 and Cdc42. *J Biol Chem* 2008;283:34457–68.
63. Kim JY, Park HK, Yoon JS, Kim SJ, Kim ES, Ahn KS, et al. Advanced glycation end product (AGE)-induced proliferation of HEL cells via receptor for AGE-related signal pathways. *Int J Oncol* 2008;33:493–501.
64. Messmer D, Yang H, Telusma G, Knoll F, Li J, Messmer B, et al. High mobility group box protein 1: an endogenous signal for dendritic cell maturation and Th1 polarization. *J Immunol* 2004;173:307–13.
65. Manfredi AA, Capobianco A, Esposito A, De Cobelli F, Canu T, Monno A, et al. Maturing dendritic cells depend on RAGE for in vivo homing to lymph nodes. *J Immunol* 2008;180:2270–5.
66. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* 2007;13:1050–9.
67. Youn JH, Oh YJ, Kim ES, Choi JE, Shin JS. High mobility group box 1 protein binding to lipopolysaccharide facilitates transfer of lipopolysaccharide to CD14 and enhances lipopolysaccharide-mediated TNF-alpha production in human monocytes. *J Immunol* 2008;180:5067–74.
68. Urbonaviciute V, Furnrohr BG, Meister S, Munoz L, Heyder P, De Marchis F, et al. Induction of inflammatory and immune responses by HMGB1-nucleosome complexes: implications for the pathogenesis of SLE. *J Exp Med* 2008;205:3007–18.
69. Bianchi ME. HMGB1 loves company. *J Leuk Biol* 2009;86:573–6.
70. Ivanov S, Dragoi AM, Wang X, Dallacosta C, Louten J, Musco G, et al. A novel role for HMGB1 in TLR9-mediated inflammatory responses to CpG-DNA. *Blood* 2007;110:1970–81.
71. Sha Y, Zmijewski J, Xu Z, Abraham E. HMGB1 develops enhanced proinflammatory activity by binding to cytokines. *J Immunol* 2008;180:2531–7.
72. Chen GY, Tang J, Zheng P, Liu Y. CD24 and Siglec-10 selectively repress tissue damage-induced immune responses. *Science* 2009;323:1722–5.
73. Li J, Xie H, Wen T, Liu H, Zhu W, Chen X. Expression of high mobility group box chromosomal protein 1 and its modulating effects on downstream cytokines in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2010;37:766–75.
74. Bruchfeld A, Wendt M, Bratt J, Qureshi AR, Chavan S, Tracey KJ, et al. High-mobility group box-1 protein (HMGB1) is increased in antineutrophilic cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis with renal manifestations. *Mol Med* 2011;17:29–35.
75. Abdulahad DA, Westra J, Bijzet J, Limburg PC, Kallenberg CG, Bijl M. High mobility group box 1 (HMGB1) and anti-HMGB1 antibodies and their relation to disease characteristics in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2011;13:R71.
76. Abdulahad DA, Westra J, Limburg PC, Kallenberg CG, Bijl M. HMGB1 in systemic lupus erythematosus: its role in cutaneous lesions development. *Autoimmun Rev* 2010;9:661–5.
77. Kokkola R, Sundberg E, Ulfgrén AK, Palmblad K, Li J, Wang H, et al. High mobility group box chromosomal protein 1: a

- novel proinflammatory mediator in synovitis. *Arthritis Rheum* 2002;46:2598–603.
78. Kokkola R, Li J, Sundberg E, Aveberger AC, Palmblad K, Yang H, et al. Successful treatment of collagen-induced arthritis in mice and rats by targeting extracellular high mobility group box chromosomal protein 1 activity. *Arthritis Rheum* 2003;48:2052–8.
 79. Taniguchi N, Kawahara K, Yone K, Hashiguchi T, Yamakuchi M, Goto M, et al. High mobility group box chromosomal protein 1 plays a role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis as a novel cytokine. *Arthritis Rheum* 2003;48:971–81.
 80. Zhou Z, Han JY, Xi CX, Xie JX, Feng X, Wang CY, et al. HMGB1 regulates RANKL-induced osteoclastogenesis in a manner dependent on RAGE. *J Bone Miner Res* 2008;23:1084–96.
 81. Zhang S, Zhong J, Yang P, Gong F, Wang CY. HMGB1, an innate alarmin, in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Int J Clin Exp Pathol* 2009;3:24–38.
 82. Han J, Zhong J, Wei W, Wang Y, Huang Y, Yang P, et al. Extracellular high-mobility group box 1 acts as an innate immune mediator to enhance autoimmune progression and diabetes onset in NOD mice. *Diabetes* 2008;57:2118–27.
 83. Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, et al. HMGB-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 1999;285:248–51.
 84. Liliensiek B, Weigand MA, Bierhaus A, Nicklas W, Kasper M, Hofer S, et al. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) regulates sepsis but not the adaptive immune response. *J Clin Invest* 2004;113:1641–50.
 85. Plitas G, Burt BM, Nguyen HM, Bamboat ZM, DeMatteo RP. Toll-like receptor 9 inhibition reduces mortality in polymicrobial sepsis. *J Exp Med* 2008;205:1277–83.
 86. Cohen MJ, Brohi K, Calfee CS, Rahn P, Chesebro BB, Christiaans SC, et al. Early release of high mobility group box nuclear protein 1 after severe trauma in humans: role of injury severity and tissue hypoperfusion. *Crit Care* 2009;13:R174.
 87. Lantos J, Foldi V, Roth E, Weber G, Bogar L, Csontos C. Burn trauma induces early HMGB1 release in patients: its correlation with cytokines. *Shock* 2010;33:562–7.
 88. Manganelli V, Signore M, Pacini I, Misasi R, Tellan G, Garofalo T, et al. Increased HMGB1 expression and release by mononuclear cells following surgical/anesthesia trauma. *Crit Care* 2010;14:R197.
 89. Lee BW, Chae HY, Kwon SJ, Park SY, Ihm J, Ihm SH. RAGE ligands induce apoptotic cell death of pancreatic beta-cells via oxidative stress. *Int J Mol Med* 2010;26:813–8.
 90. Yan XX, Lu L, Peng WH, Wang LJ, Zhang Q, Zhang RY, et al. Increased serum HMGB1 level is associated with coronary artery disease in nondiabetic and type 2 diabetic patients. *Atherosclerosis* 2009;205:544–8.
 91. Inoue K, Kawahara K, Biswas KK, Ando K, Mitsudo K, Nobuyoshi M, et al. HMGB1 expression by activated vascular smooth muscle cells in advanced human atherosclerosis plaques. *Cardiovasc Pathol* 2007;16:136–43.
 92. Xu H, Yao Y, Su Z, Yang Y, Kao R, Martin CM, et al. Endogenous HMGB1 contributes to ischemia-reperfusion-induced myocardial apoptosis by potentiating the effect of TNF- α /JNK. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;300:H913–21.
 93. Takata K, Kitamura Y, Tsuchiya D, Kawasaki T, Taniguchi T, Shimohama S. High mobility group box protein-1 inhibits microglial Abeta clearance and enhances Abeta neurotoxicity. *J Neurosci Res* 2004;78:880–91.
 94. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57–70.
 95. Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet* 2005;6:611–22.
 96. Stewart SA, Weinberg RA. Telomeres: cancer to human aging. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006;22:531–57.
 97. Pallier C, Scaffidi P, Chopineau-Proust S, Agresti A, Nordmann P, Bianchi ME, et al. Association of chromatin proteins high mobility group box (HMGB) 1 and HMGB2 with mitotic chromosomes. *Mol Biol Cell* 2003;14:3414–26.
 98. Cotmore SF, Christensen J, Tattersall P. Two widely spaced initiator binding sites create an HMGB1-dependent parvovirus rolling-hairpin replication origin. *J Virol* 2000;74:1332–41.
 99. Brezniceanu ML, Volp K, Bosser S, Solbach C, Lichter P, Joos S, et al. HMGB1 inhibits cell death in yeast and mammalian cells and is abundantly expressed in human breast carcinoma. *Faseb J* 2003;17:1295–7.
 100. Tang D, Kang R, Cheh CW, Livesey KM, Liang X, Schapiro NE, et al. HMGB1 release and redox regulates autophagy and apoptosis in cancer cells. *Oncogene* 2010;29:5299–310.
 101. Kang R, Tang D, Schapiro NE, Livesey KM, Farkas A, Loughran P, et al. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) sustains autophagy and limits apoptosis, promoting pancreatic tumor cell survival. *Cell Death Different* 2009;17:666–76.
 102. Park JS, Svetkauskaite D, He Q, Kim JY, Strassheim D, Ishizaka A, et al. Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem* 2004;279:7370–7.
 103. Yoon S, Lee JY, Yoon BK, Bae DS, Choi DS. Effects of HMGB-1 overexpression on cell-cycle progression in MCF-7 cells. *J Korean Med Sci* 2004;19:321–6.
 104. Jiao Y, Wang HC, Fan SJ. Growth suppression and radiosensitivity increase by HMGB1 in breast cancer. *Acta Pharmacol Sin* 2007;28:1957–67.
 105. Schlueter C, Weber H, Meyer B, Rogalla P, Roser K, Hauke S, et al. Angiogenetic signaling through hypoxia: HMGB1: an angiogenetic switch molecule. *Am J Pathol* 2005;166:1259–63.
 106. van Beijnum JR, Buurman WA, Griffioen AW. Convergence and amplification of toll-like receptor (TLR) and receptor for advanced glycation end products (RAGE) signaling pathways via high mobility group B1 (HMGB1). *Angiogenesis* 2008;11:91–9.
 107. Sasahira T, Kirita T, Bhawal UK, Ikeda M, Nagasawa A, Yamamoto K, et al. The expression of receptor for advanced glycation end products is associated with angiogenesis in human oral squamous cell carcinoma. *Virchows Arch* 2007;450:287–95.
 108. Sasahira T, Kirita T, Oue N, Bhawal UK, Yamamoto K, Fujii K, et al. High mobility group box-1-inducible melanoma inhibitory activity is associated with nodal metastasis and lymphangiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 2008;99:1806–12.
 109. Sasahira T, Akama Y, Fujii K, Kuniyasu H. Expression of receptor for advanced glycation end products and HMGB1/ amphoterin in colorectal adenomas. *Virchows Arch* 2005;446:411–5.
 110. Kuniyasu H, Oue N, Wakikawa A, Shigeishi H, Matsutani N, Kuraoka K, et al. Expression of receptors for advanced

- glycation end-products (RAGE) is closely associated with the invasive and metastatic activity of gastric cancer. *J Pathol* 2002;196:163–70.
111. Aychek T, Miller K, Sagi-Assif O, Levy-Nissenbaum O, Israeli-Amit M, Pasmanik-Chor M, et al. E-selectin regulates gene expression in metastatic colorectal carcinoma cells and enhances HMGB1 release. *Int J Cancer* 2008;123:1741–50.
 112. Luo Y, Ohmori H, Fujii K, Moriwaka Y, Sasahira T, Kurihara M, et al. HMGB1 attenuates anti-metastatic defence of the liver in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2010;46:791–9.
 113. Moriwaka Y, Luo Y, Ohmori H, Fujii K, Tatumoto N, Sasahira T, et al. HMGB1 attenuates anti-metastatic defense of the lymph nodes in colorectal cancer. *Pathobiology* 2010;77:17–23.
 114. Takada M, Koizumi T, Toyama H, Suzuki Y, Kuroda Y. Differential expression of RAGE in human pancreatic carcinoma cells. *Hepatogastroenterology* 2001;48:1577–8.
 115. Cavallo F, De Giovanni C, Nanni P, Forni G, Lollini PL. 2011: the immune hallmarks of cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2011;60:319–26.
 116. Yu M, Wang H, Ding A, Golenbock DT, Latz E, Czura CJ, et al. HMGB1 signals through toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2. *Shock* 2006;26:174–9.
 117. Shiratsuchi A, Watanabe I, Takeuchi O, Akira S, Nakanishi Y. Inhibitory effect of Toll-like receptor 4 on fusion between phagosomes and endosomes/lysosomes in macrophages. *J Immunol* 2004;172:2039–47.
 118. He Q, Liang CH, Lippard SJ. Steroid hormones induce HMGB1 overexpression and sensitize breast cancer cells to cisplatin and carboplatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:5768–72.
 119. Dumitriu IE, Baruah P, Valentinis B, Voll RE, Herrmann M, Nawroth PP, et al. Release of high mobility group box 1 by dendritic cells controls T cell activation via the receptor for advanced glycation end products. *J Immunol* 2005;174:7506–15.
 120. Dong Xda E, Ito N, Lotze MT, Demarco RA, Popovic P, Shand SH, et al. High mobility group box I (HMGB1) release from tumor cells after treatment: implications for development of targeted chemoimmunotherapy. *J Immunother* 2007;30:596–606.
 121. Formenti SC, Demaria S. Effects of chemoradiation on tumor-host interactions: the immunologic side. *J Clin Oncol* 2008;26:1562–3.
 122. Aymeric L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Martins I, Kroemer G, et al. Tumor cell death and ATP release prime dendritic cells and efficient anticancer immunity. *Cancer Res* 2010;70:855–8.
 123. Zitvogel L, Kepp O, Kroemer G. Decoding cell death signals in inflammation and immunity. *Cell* 2010;140:798–804.
 124. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 2002;418:191–5.
 125. Bustin M. At the crossroads of necrosis and apoptosis: signaling to multiple cellular targets by HMGB1. *Sci STKE* 2002;2002:pe39.
 126. Yamada Y, Fujii T, Ishijima R, Tachibana H, Yokoue N, Takasawa R, et al. The release of high mobility group box 1 in apoptosis is triggered by nucleosomal DNA fragmentation. *Arch Biochem Biophys* 2011;506:188–93.
 127. Thorburn J, Horita H, Redzic J, Hansen K, Frankel AE, Thorburn A. Autophagy regulates selective HMGB1 release in tumor cells that are destined to die. *Cell Death Different* 2009;16:175–83.
 128. Kazama H, Ricci JE, Herndon JM, Hoppe G, Green DR, Ferguson TA. Induction of immunological tolerance by apoptotic cells requires caspase-dependent oxidation of high-mobility group box-1 protein. *Immunity* 2008;29:21–32.
 129. Qin S, Wang H, Yuan R, Li H, Ochani M, Ochani K, et al. Role of HMGB1 in apoptosis-mediated sepsis lethality. *J Exp Med* 2006;203:1637–42.
 130. Tsung A, Klune JR, Zhang X, Jeyabalan G, Cao Z, Peng X, et al. HMGB1 release induced by liver ischemia involves Toll-like receptor 4 dependent reactive oxygen species production and calcium-mediated signaling. *J Exp Med* 2007;204:2913–23.
 131. Hamada T, Torikai M, Kuwazuru A, Tanaka M, Horai N, Fukuda T, et al. Extracellular high mobility group box chromosomal protein 1 is a coupling factor for hypoxia and inflammation in arthritis. *Arthritis Rheum* 2008;58:2675–85.
 132. Andersson U, Wang H, Palmblad K, Aveberger AC, Bloom O, Erlandsson-Harris H, et al. High mobility group 1 protein (HMGB-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *J Exp Med* 2000;192:565–70.
 133. Cheng BQ, Liu CT, Li WJ, Fan W, Zhong N, Zhang Y, et al. Ethyl pyruvate improves survival and ameliorates distant organ injury in rats with severe acute pancreatitis. *Pancreas* 2007;35:256–61.
 134. Peltz ED, Moore EE, Eckels PC, Damle SS, Tsuruta Y, Johnson JL, et al. HMGB1 is markedly elevated within 6 hours of mechanical trauma in humans. *Shock* 2009;32:17–22.
 135. Begum N, Pash JM, Bhorjee JS. Expression and synthesis of high mobility group chromosomal proteins in different rat skeletal cell lines during myogenesis. *J Biol Chem* 1990;265:11936–41.
 136. Skoko D, Wong B, Johnson RC, Marko JF. Micromechanical analysis of the binding of DNA-bending proteins HMGB1, NHP6A, and HU reveals their ability to form highly stable DNA-protein complexes. *Biochemistry* 2004;43:13867–74.
 137. Barnay-Verdier S, Gaillard C, Messmer M, Borde C, Gibot S, Marechal V. PCA-ELISA: a sensitive method to quantify free and masked forms of HMGB1. *Cytokine* 2011;55:4–7.
 138. Beiter T, Fragasso A, Hudemann J, Niess AM, Simon P. Short-term treadmill running as a model for studying cell-free DNA kinetics in vivo. *Clin Chem* 2011;57:633–6.
 139. Sanford AN, Dietzmann K, Sullivan KE. Apoptotic cells, autoantibodies, and the role of HMGB1 in the subcellular localization of an autoantigen. *J Autoimmun* 2005;25:264–71.
 140. Ito T, Kawahara K, Okamoto K, Yamada S, Yasuda M, Imaizumi H, et al. Proteolytic cleavage of high mobility group box 1 protein by thrombin-thrombomodulin complexes. *Arteriosclerosis Thromb Vasc Biol* 2008;28:1825–30.
 141. Parkkinen J, Rauvala H. Interactions of plasminogen and tissue plasminogen activator (t-PA) with amphotericin. Enhancement of t-PA-catalyzed plasminogen activation by amphotericin. *J Biol Chem* 1991;266:16730–5.
 142. Zhang F, He Y, Duan Z. Changes of high mobility group box 1 in serum of pig acute hepatic failure model and significance. *J Shazhong Univ Sci Technol Med Sci* 2008;28:52–5.
 143. Bruchfeld A, Qureshi AR, Lindholm B, Barany P, Yang L, Stenvinkel P, et al. High mobility group box protein-1 correlates

- with renal function in chronic kidney disease (CKD). *Mol Med* 2008;14:109–15.
144. Urbonaviciute V, Furnrohr BG, Weber C, Haslbeck M, Wilhelm S, Herrmann M, et al. Factors masking HMGB1 in human serum and plasma. *J Leuk Biol* 2007;81:67–74.
 145. Gaillard C, Borde C, Gozlan J, Marechal V, Strauss F. A high-sensitivity method for detection and measurement of HMGB1 protein concentration by high-affinity binding to DNA hemicatenanes. *Plos One* 2008;3:e2855.
 146. Wittwer C, Lehner J, Fersching D, Siegele B, Stoetzer OJ, Holdenrieder S. Methodological and preanalytical evaluation of a RAGE immunoassay. *Anticancer Res* 2012;32:2075–8.
 147. Kim J, Sohn E, Kim CS, Jo K, Kim JS. The role of high-mobility group box-1 protein in the development of diabetic nephropathy. *Am J Nephrol* 2011;33:524–9.
 148. Geroldi D, Falcone C, Minoretta P, Emanuele E, Arra M, D'Angelo A. High levels of soluble receptor for advanced glycation end products may be a marker of extreme longevity in humans. *J Am Geriatr Soc* 2006;54:1149–50.
 149. Stahl J, Wolf K, Durner J, Nagel D, Höcherl EF, Holdenrieder S. HMGB1, RAGE and nucleosomes as new prognostic serum markers after multiple trauma. *Shock* 2013; submitted.
 150. Bopp C, Hofer S, Weitz J, Bierhaus A, Nawroth PP, Martin E, et al. sRAGE is elevated in septic patients and associated with patients outcome. *J Surg Res* 2008;147:79–83.
 151. Lindstrom O, Tukiainen E, Kylanpaa L, Mentula P, Rouhiainen A, Puolakkainen P, et al. Circulating levels of a soluble form of receptor for advanced glycation end products and high-mobility group box chromosomal protein 1 in patients with acute pancreatitis. *Pancreas* 2009;38:e215–20.
 152. Kocsis AK, Szabolcs A, Hofner P, Takacs T, Farkas G, Boda K, et al. Plasma concentrations of high-mobility group box protein 1, soluble receptor for advanced glycation end-products and circulating DNA in patients with acute pancreatitis. *Pancreatol* 2009;9:383–91.
 153. Ma CY, Jiao YL, Zhang J, Yang QR, Zhang ZF, Shen YJ, et al. Elevated plasma level of HMGB1 is associated with disease activity and combined alterations with IFN-alpha and TNF-alpha in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* 2012;32:395–402.
 154. Goldstein RS, Bruchfeld A, Yang L, Qureshi AR, Gallowitsch-Puerta M, Patel NB, et al. Cholinergic anti-inflammatory pathway activity and High Mobility Group Box-1 (HMGB1) serum levels in patients with rheumatoid arthritis. *Mol Med* 2007;13:210–5.
 155. Thomas MC, Soderlund J, Lehto M, Makinen VP, Moran JL, Cooper ME, et al. Soluble receptor for AGE (RAGE) is a novel independent predictor of all-cause and cardiovascular mortality in type 1 diabetes. *Diabetol* 2011;54:2669–77.
 156. Shang GH, Jia CQ, Tian H, Xiao W, Li Y, Wang AH, et al. Serum high mobility group box protein 1 as a clinical marker for non-small cell lung cancer. *Respir Med* 2009;103:1949–53.
 157. Naumnik W, Nilklinska W, Ossolinska M, Chytczewska E. Serum levels of HMGB1, survivin, and VEGF in patients with advanced non-small cell lung cancer during chemotherapy. *Folia Histochem Cytobiol* 2009;47:703–9.
 158. Chung H, Lee S-G, Kim H, Hong D, Chung J, Stroncek D, et al. Serum high mobility group box-1 (HMGB1) is closely associated with the clinical and pathologic features of gastric cancer. *J Transl Med* 2009;7:38.
 159. Cheng BQ, Jia CQ, Liu CT, Lu XF, Zhong N, Zhang ZL, et al. Serum high mobility group box chromosomal protein 1 is associated with clinicopathologic features in patients with hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis* 2008;40:446–52.
 160. Sheng X, Du X, Zhang X, Li D, Lu C, Li Q, et al. Clinical value of serum HMGB1 levels in early detection of recurrent squamous cell carcinoma of uterine cervix: comparison with serum SCCA, CYFRA21-1, and CEA Levels. *Croat Med J* 2009;50:455–64.
 161. Fahmueller Y, Nagel D, Hoffmann RT, Tatsch K, Jakobs T, Stieber P, et al. Immunogenic cell death biomarkers HMGB1, RAGE and DNase indicate response to selective internal radiation therapy in colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 2012; published online.
 162. Kohles N, Nagel D, Jüngst D, Durner J, Stieber P, Holdenrieder S. Predictive value of immunogenic cell death biomarkers HMGB1, sRAGE and DNase in liver cancer patients receiving transarterial chemoembolization therapy. *Tumor Biol* 2012;33:2401–9.
 163. Stoetzer OJ, Fersching DM, Salat C, Steinkohl O, Gabka CJ, Hamann U, et al. Circulating immunogenic cell death biomarkers HMGB1 and RAGE in breast cancer patients during neoadjuvant chemotherapy. *Tumor Biol* 2013;34:81–90.
 164. Wittwer C, Boeck S, Heinemann V, Haas M, Stieber P, Nagel D, et al. Circulating nucleosomes and immunogenic cell death markers HMGB1, RAGE, DNase in patients with advanced pancreatic cancer undergoing chemotherapy. *Int J Cancer* 2013 [in review].
 165. Abraham E. Unraveling the role of high mobility group box protein 1 in severe trauma. *Crit Care* 2009;13:1004.
 166. Barnay-Verdier S, Fattoum L, Borde C, Kaveri S, Gibot S, Marechal V. Emergence of autoantibodies to HMGB1 is associated with survival in patients with septic shock. *Intensive Care Med* 2011;37:957–62.
 167. Devaraj S, Dasu MR, Park SH, Jialal I. Increased levels of ligands of toll-like receptors 2 and 4 in type 1 diabetes. *Diabetologia* 2009;52:1665–8.
 168. Hu X, Jiang H, Bai Q, Zhou X, Xu C, Lu Z, et al. Increased serum HMGB1 is related to the severity of coronary artery stenosis. *Clin Chim Acta* 2009;406:139–42.
 169. Goldstein RS, Gallowitsch-Puerta M, Yang L, Rosas-Ballina M, Huston JM, Czura CJ, et al. Elevated high-mobility group box 1 levels in patients with cerebral and myocardial ischemia. *Shock* 2006;25:571–4.
 170. Andrassy M, Volz HC, Riedle N, Gitsioudis G, Seidel C, Laohachewin D, et al. HMGB1 as a predictor of infarct transmural and functional recovery in patients with myocardial infarction. *J Intern Med* 2011;270:245–53.
 171. Maillard-Lefebvre H, Boulanger E, Daroux M, Gaxatte C, Hudson BI, Lambert M. Soluble receptor for advanced glycation end products: a new biomarker in diagnosis and prognosis of chronic inflammatory diseases. *Rheumatol* 2009;48:1190–6.
 172. Lehner J, Wittwer C, Fersching D, Siegele B, Holdenrieder S, Stoetzer OJ. Methodological and preanalytical evaluation of an HMGB1 immunoassay. *Anticancer Res* 2012;32:2059–62.
 173. Fahmueller Y, Nagel D, Hoffmann RT, Tatsch K, Jakobs T, Stieber P, et al. Predictive and prognostic value of circulating nucleosomes and serum biomarkers in patients with metastasized colorectal cancer undergoing selective internal radiation therapy. *BMC Cancer* 2012;12:5.

174. Kohles N, Nagel D, Jungst D, Durner J, Stieber P, Holdenrieder S. Relevance of circulating nucleosomes and oncological biomarkers for predicting response to transarterial chemoembolization therapy in liver cancer patients. *BMC Cancer* 2011;11:202.
175. Boeck S, Wittwer C, Heinemann V, Haas M, Stieber P, Nagel D, et al. Cytokeratin 19-fragments (CYFRA 21-1) as a novel serum biomarker for response and survival in patients with advanced pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2013 [in review].
176. Stoetzer OJ, Wittwer C, Lehner J, Fahmueller YN, Kohles N, Fersching DM, et al. Circulating nucleosomes and biomarkers of immunogenic cell death as predictive and prognostic markers in cancer patients undergoing cytotoxic therapy. *Expert Opin Biol Ther* 2012;12:S217–24.