

## Značenje alarmina u upalnim reumatskim bolestima

Dubravka BOBEK<sup>1</sup>, Marija JELUŠIĆ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centar za fizikalnu i rehabilitacijsku medicinu s reumatologijom,  
Klinička bolnica Dubrava, Zagreb

<sup>2</sup>Zavod za kliničku imunologiju, reumatologiju, respiracijske i alergološke bolesti  
Klinika za pedijatriju, Klinički bolnički centar „Rebro“, Zagreb

Primljeno / Received : 2015-03-03; Prihvaćeno / Accepted: 2015-04-10

Dopisivanje s:

dr. sc. Dubravka Bobek. dr. med.

Centar za fizikalnu i rehabilitacijsku medicinu s reumatologijom

KB Dubrava, Zagreb

Avenija Gojka Šuška 6

Tel. 01 2903 240

E-mail: dubravka.bobek@hotmail.com

### Sažetak

Razumijevanje imunopatogeneze upalnih reumatskih bolesti još uvijek je nepotpuno. Iako je opisana uloga alarmina u različitim upalnim i autoimunim bolestima, klinička ispitivanja iz tog područja još uvijek su rijetka. U radu je prikazana literatura koja govori o značenju trinajčešća alarmina: proteina visoke pokretljivosti iz skupine 1 (HMGB1, engl. high mobility group box 1), proteina koji vežu kalcij S100A8/9 i S100A12 (S100A8/9, S100A12, engl. calcium-binding protein S100A12) i njihova topljiva receptora za krajnje produkte uznapredovale glikozilacije sRAGE (RAGE, engl. soluble receptor for advanced glycation end products) u upalnim reumatskim bolestima. Prema dosadašnjim spoznajama smatra se da HMGB1, kao medijator prirodene imunosti, u interakciji sa sRAGE sudjeluje u imunopatogenezi upalnih reumatskih bolesti te može služiti kao biomarker za određivanje aktivnosti i moguća meta u liječenju navedene skupine bolesnika.

**Ključne riječi:** HMGB1,S100A12,sRAGE, upalne reumatske bolesti

## **The significance of alarmins in inflammatory rheumatic diseases**

### **Abstract**

Our understanding of the immunopathogenesis of inflammatory rheumatic diseases is still incomplete. The involvement of alarmins in various inflammatory and autoimmune diseases has been documented but clinical trials on the contribution of these molecules are basically absent. In this article we summarized the literature about the significance of the three most common alarmins: high mobility group box 1 (HMGB1), calcium-binding proteins S100A8/9 and S100A12 and their soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) in inflammatory rheumatic diseases. According to our previous knowledge, it is considered that HMGB1 through interactions with sRAGE contributes to immunopathogenesis of inflammatory rheumatic diseases. Furthermore, HMGB1 may serve as a biomarker for determining disease activity and a potential target of therapy in systemic inflammatory rheumatic diseases patients.

**Key words:** HMGB1,S100A12,sRAGE, inflammatory rheumatic diseases.

### **Alarmini kao medijatori prirodene imunosti**

Danas je poznato da neravnoteža između protuupalnih i proupalnih citokina čini samo dio složenog imunskog poremećaja i sve se više naglašava važnost prirodene imunosti u imunopatogenezi brojnih upalnih reumatskih bolesti. Naime, otkrivanje ključnih načela aktiviranja prirodnog imunskog sustava, tj. dokazivanje receptora za prepoznavanje strukturnih „predložaka“ (PRR, engl. pattern recognition receptors) izbrisalo je granicu između nespecifične i specifične imunosti te promijenilo postojeće razumijevanje imunskog sustava. Navedeni receptori izraženi su na površini i u citoplazmi prvenstveno stanica prirodene imunosti, primjerice neutrofila, makrofaga i dendritičkih stanica. Interakcija receptora i ciljnih struktura aktivira imunostne stanice da stvaraju razne citokine i druge medijatore s ciljem uklanjanja patogena. Makrofagi i dendritičke stanice, osim što su efektorske stanice prirodene imunosti, predstavljaju i predočne stanice jer izražavaju HLA i kostimulacijske molekule koje im omogućuju predočavanje antigena limfocitima T i B te aktivaciju efektorskih mehanizama stečene imunosti. Rezultati istraživanja zadnjeg desetljeća sve više ukazuju na to da imunski sustav može prepoznati ne samo egzogene čimbenike (PAMP, engl. pathogen-associated molecular pattern) ili patogene nego i endogene signale opasnosti ili molekule koje se nazivaju

alarmini ili molekule pridružene oštećenju (DAMP, engl. damage-associated molecular patterns) (1).

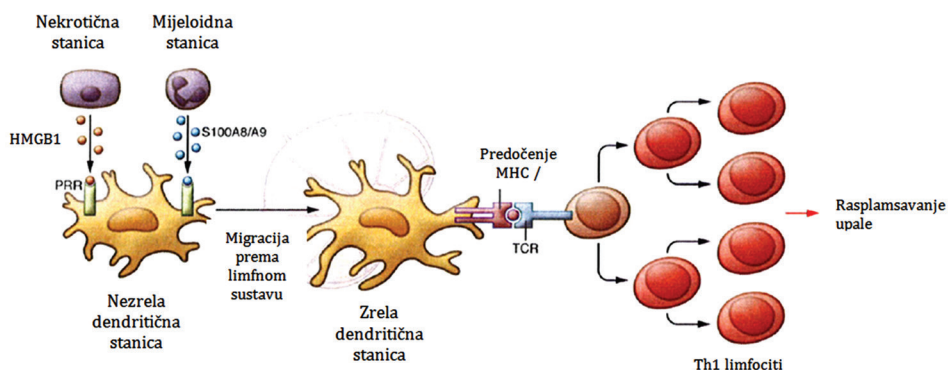
Alarmini su skupina strukturno različitih, multifunkcionalnih, endogenih molekula koje se pasivno otpuštaju iz nekrotičnih stanica nakon infekcije ili oštećenja tkiva ili ih rapidno izlučuju stimulirani leukociti i epitelne stanice. Akonema oštećenja tkiva ili infekcije, alarmini imaju brojne fiziološke uloge unutar stanice. Međutim, nakon što su jednom otpušteni u međustanični prostor, alarmini djeluju kao citokini i aktiviraju stanice prirodene imunosti (neutrofile, makrofage) te regrutiraju antigen-prezentirajuće stanice (dendritičke stanice) putem prepoznavanja receptora za molekularne obrasce primjerice receptora sličnih Tollu (TLR engl. Toll-like receptors) ili receptora za krajnje produkte uznapredovale glikozilacije (RAGE, engl. receptor for advanced glycation end products) (2). Ključna sposobnost alarmina je da pojačavanjem prirodnog imunskog odgovora posredno djeluju na stečenu imunost te tako povezuju prirodenu i stečenu krak imunskog odgovora (3).

U alarminsku obitelj ubrajaju se brojni članovi, uključujući: protein visoke pokretljivosti iz skupine 1 (HMGB1, engl. high mobility group box 1 protein), proteine iz skupine S100 koji vežu kalcij (npr. S100A8, S100A9 i S100A12, engl. calcium-binding proteins), proteine toplinskog šoka (HSPs, engl. heat-shock proteins), neke citokine, primjerice IL1- $\alpha$  i IL-33, fibrile amiloida- $\beta$ , hijaluronske fragmente (4,5,6).

Smatra se da alarmini sudjeluju u imunopatogenezi brojnih upalnih reumatskih bolesti te su opisane povišene razine alarmina u serumu, sinovijalnoj tekućini ili sinoviji u reumatoidnom artritisu (7), sistemskom eritemskom lupusu (8-11), Kawasakijevom vaskulitisu (12), dermatomiozitisu (13) i Sjogrenovom sindromu (14), a također i u sepsi (15), aterosklerozi (16) te u psorijazi (17).

### **Uloga alarmina u rasvjetljavanju patogeneze upalnih reumatskih bolesti**

Općenito je prihvaćena uloga alarmina u pojačavanju i održavanju upalnog procesa. Alarmini regrutiraju nezrele dendritične stanice koje prenose antigene do sekundarnih limfnih organa, gdje ih prezentiraju naivnim T limfocitima i induciraju stečeni imunski odgovor (18-20). Kontinuirano oslobađanje alarmina uzrokuje izražavanje MHC molekula, prezentaciju antigena i nekontroliranu proliferaciju T limfocita, što dovodi do rasplamsavanja upale (Slika 1). Tako reguliranjem stečenog imunskog odgovora alarmini potiču kroničnu upalu i autoimunost.



**Slika 1.** Reguliranjem stečenog imunskog odgovora alarmini potiču kroničnu upalu i autoimunost. Alarmini regrutiraju nezrele dendritične stanice i potiču njihovo funkcionalno sazrijevanje, potiču ih da prihvate antigene i dopremaju ih u sekundarne limfne organe, gdje će prezentirati antigenske epitope naivnim T limfocitima i poticati njihovu Th1 polarizaciju te izazvati stečeni imunski odgovor. Perzistentno oslobađanje alarmina regulira izražavanje MHC molekule tipa I i 2 te prezentaciju antigena, kao i nekontroliranu proliferaciju T limfocita, dovodeći do raspalsavanja upale. Kratice: HMGB1=protein visoke pokretljivosti iz skupine 1 (HMGB1, engl. high mobility group box 1-protein); S100A8/9= proteini koji vežu kalcij S100A8/9 (S100A8/ S100A9, engl. calcium-binding proteins); MHC=glavni kompleks gena tkivne podudarnosti (MHC, engl. major histocompatibility complex); TCR=receptor T limfocita (TCR, engl. T-Cell Receptor) (prilagođeno prema referenci br. 4).

Alarmini aktiviraju endotelne stanice, regrutiraju i stimuliraju makrofage da produciraju proupalne citokine, primjerice TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$ , dovodeći do razaranja zglobnih struktura (21-25). Dokazan je pojačan izražaj alarmina S100A8, S100A9 na fagocitima upalom zahvaćenih zglobova (7).

Značajan doprinos potvrđivanju uloge HMGB1 u upalnim reumatskim bolestima postignut je istraživanjima ovog alarmina u sistemskom eritemskom lupusu (SLE). Rezultati su pokazali da je HMGB1 uključen u patogenezu SLE-a te se smatra da bi mogao predstavljati biljeg i novu metu u liječenju ove bolesti (8, 26-32). Naime, pogoršanje simptoma kod SLE-a karakterizirano je snažnom aktivacijom imunskog sustava i pojačanim odumiranjem stanica, što izaziva oslobađanje HMGB1 u izvanstanični prostor. Povišena razina HMGB1 u izvanstaničnom prostoru dovodi do povišene sistemske razine proteina HMGB1, za koji se smatra da je u skladu s aktivnošću bolesti. Međutim, pokazalo se da konvencionalni način određivanja razine alarmina ELISA testom može dati lažno negativne rezultate u bolesnika sa SLE-om zbog stvaranja brojnih protutijela u sklopu osnovne bolesti (33,34). Zbog navedenog Andersson i Rauvala u svom recentnom radu predlažu određivanje HMGB1 tehnikom osim tehnikom ELISA i western blot tehnikom (35).

Nadalje, još uvijek nije jasno djeluju li HMGB1 protutijela zaštitno ili štetno za bolesnika koji boluje od SLE-a. Naime, većina stanica odumire zbog primarne nekroze, dok stanice koje odumiru programiranom smrću prolaze kroz sekundarnu nekrozu i tako oslobađaju nuklearni HMGB1. Nadalje, Urbonaviciute i Voll u svom su radu opisali kako HMGB1-nukleosom kompleks inhibira toleranciju na nuklearne komponente uključujući dsDNA u bolesnika sa SLE-om, dok Yanai i suradnici HMGB1 smatraju direktno uključenim u regulaciju produkcije INF- $\alpha$ , koji se smatra centralnim citokinom u patogenezi SLE-a (26,8,36). Treba napomenuti da se većina autora slaže kako je proupalna aktivnost HMGB1 u SLE-u uvjetovana redoksstatusom aminokiseline cisteina na poziciji 106, dok će oksidacija istog eliminirati proupalni učinak HMGB1, što je ključna tema novih istraživanja (37-39).

### **Uloga alarmina kao pokazatelja aktivnosti i težine upalnih reumatskih bolesti**

Koncentracija S100 proteina korelira s aktivnošću bolesti u velikom broju upalnih stanja, slično laboratorijskim pokazateljima upale CRP i sedimentacije (SE) (40-42). U različitim upalnim artritima pokazalo se da serumske koncentracije alarmina S100A8/S100A9 bolje koreliraju s aktivnošću bolesti i destrukcijom zglobova nego klasični pokazatelji upale, vjerojatno zbog njihovog lokalnog izražavanja i otpuštanja u izravnom odgovoru na oštećenje tkiva (43-45). Osim toga, rezultati brojnih radova pokazuju da serumski S100A8/S100A9 proteini mogu precizno prikazati težinu bolesti i odgovor na liječenje (46) te predvidjeti recidiv bolesti, kliničku i radiološku progresiju (47,48) kao što je razvoj erozivne bolesti (49) i progresija oštećenja zglobova (50).

U nedavnim istraživanjima opisana je povišena serumska koncentracija i genski izražaj proteina koji veže kalcij S100A12 u mononuklearima periferne krvi bolesnika s reumatoidnim artritom (51-55). Osim studija koje dokazuju sistemsku ulogu proteina S100A12, imunohistokemijske analize pokazale su povećanje sinovijalnog izražaja proteina S100A12 u zglobovima pogođenim reumatoidnim ili psorijatičnim artritom (51-55). U suprotnosti prema relativno zakašnjelom otpuštanju HMGB1, rana prisutnost proteina S100 na upalnim mjestima objašnjava njihovu uključenost u ranim upalnim događajima (56,54). Povišena razina istog alarmina u odnosu na zdravu kontrolu, osim u RA i PsA, utvrđena je u upalnim crijevnim bolestima i vaskulitima (57-59).

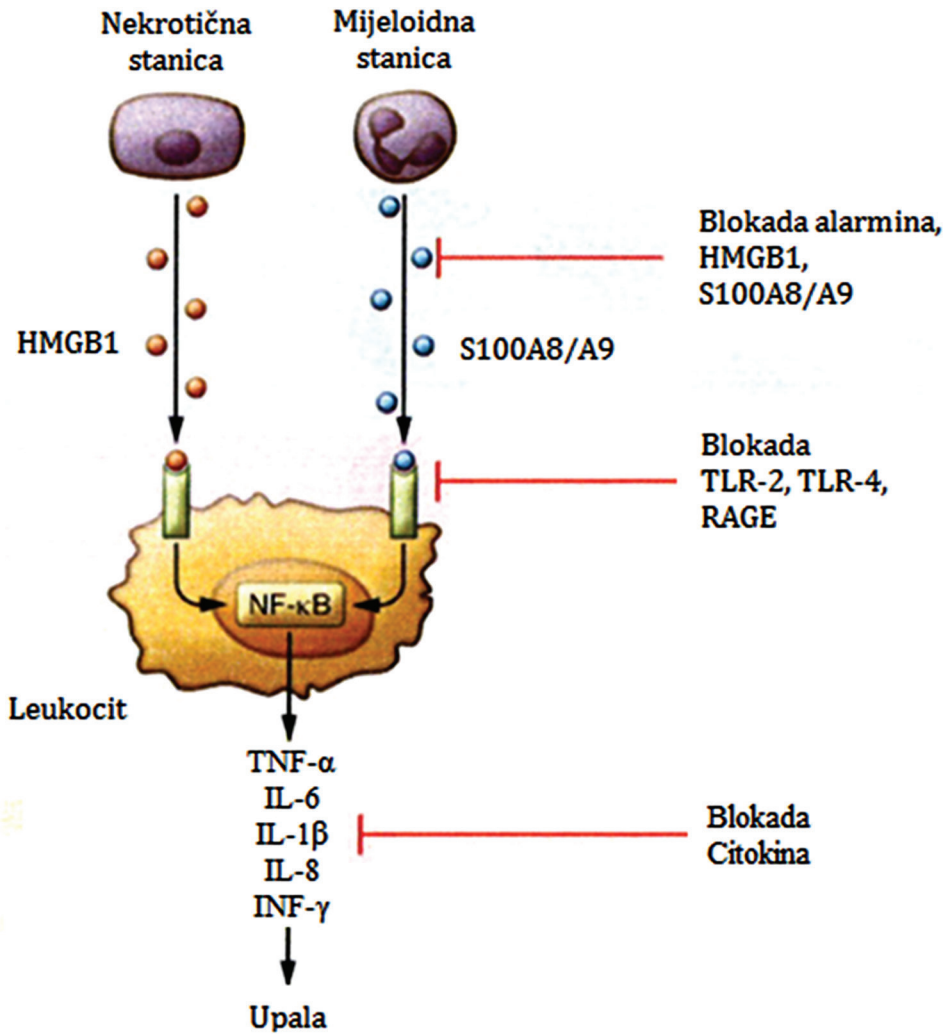
Jedno od istraživanja alarmina S100A12 u dječjoj populaciji proveli su 2008. godine Wittkowski i suradnici evaluirajući vrijednost navedenog alarmina

kao molekularnog biljega u postavljanju diferencijalne dijagnoze između sistemskog JIA-a i drugih uzroka vrućice nepoznatog podrijetla (FUO, engl. fever of unknown origin) (60).

### **Uloga alarmina u liječenju upalnih reumatskih bolesti**

Neregulirana upala je osnova patofizioloških procesa mnogih bolesti. Identifikacija proupalnih citokina posebice TNF- $\alpha$  kao terapijskog cilja 1990-ih godina dovela je do impresivnog napretka u liječenju bolesnika oboljelih od reumatoidnog artritisa (RA) (61). Nažalost, blokada citokina se nije pokazala učinkovitom u svih bolesnika (62). Nadalje, blokada citokina nije dala očekivane rezultate u liječenju bolesnika s akutnim upalnim bolestima kao što su traumom induciran sindrom sistemskog upalnog odgovora (SIRS, engl. systemic inflammatory response syndrome) ili sepsa (63). Identifikacija alarmina kao ključnih posrednika upalnih procesa u tim poremećajima i spoznaja da je njihovo oslobađanje popraćeno regulacijom receptora sugerira alarminski signalni put kao alternativni cilj liječenja (Slika 2).

Kao što je gore navedeno, nizvodna citokinska blokada uključujući TNF- $\alpha$  klinički je korisna u liječenju kroničnih upalnih bolesti i upalnih bolesti crijeva, ali nije učinkovita u svih bolesnika. Stoga, strategije koje su usmjerene na proupalna svojstva S100 proteina mogu pružiti novi pristup za imunoterapiju uzvodno od TNF- $\alpha$  i NF-KB aktivacije. Međutim, za razliku od S100 proteina, čini se da je djelovanje alarmina HMGB1 neovisno o TNF- $\alpha$  (64). Naime, anti-TNF- $\alpha$  terapija nije pokazala utjecaj na HMGB1 izražaj (65), dok su antitijela protiv HMGB1 i antagonisti A domene molekule HMGB1 uspješno inhibirali razvoj sinovijalne upale, kao i oteklinu zglobova u životinjskim modelima artritisa (66,64). Nadalje, vezanje HMGB1 s drugim endogenim molekulama poput nukleosoma poništava imunosnu toleranciju i doprinosi razvoju autoimune bolesti (8). Stoga su alarmini privlačne mete u liječenju RA i drugih kroničnih upalnih bolesti, osobito kod pacijenata koji ne reagiraju na anti-TNF- $\alpha$  terapiju. Iako još uvijek nema kliničkih studija o specifičnom liječenju kojemu je meta HMGB1, postoje studije čiji rezultati upućuju na utjecaj lijekova koji se primjenjuju u liječenju pojedinih upalnih reumatskih bolesti na HMGB1. Utvrđena je smanjena pojavnost izvanstaničnog sinovijalnog HMGB1 u bolesnika s RA-om nakon intraartikularne injekcije kortikosteroida (67). Također, dokazan je smanjen izražaj HMGB1 u mišićima bolesnika s kroničnim miozitisom nakon sistemske primjene kortikosteroida (13). Andersson i sur. (2010.) pokazali su da liječenje solima zlata, tradicionalnom terapijom za reumatoidni artritis,



**Slika 2.** Alarminski put kao potencijalna terapijska meta u upalnoj kaskadi prirodene imunosti. Uzvodni alarminski signalizacijski putovi su potencijalni terapijski ciljevi imunomodulacije u akutnim i kroničnim upalnim bolestima. U životinjskim modelima alarmini su izravno ciljani protutijelima ili kompetitivnim inhibitorima npr., domena A (HMGB1) ili su ciljani receptori koji prepoznaju molekularne obrasce (PRR, engl. pattern recognition receptors) s antitijelima ili topljivim „decoy” receptorima. Kratice: HMGB1=protein visoke pokretljivosti iz skupine 1 (HMGB1, engl. high mobility group box 1-protein); S100A8/9= proteini koji vežu kalcij S100A8/9 (S100A8/ S100A9, engl. calcium-binding proteins); TCR=receptor T limfocita (TCR, engl. T-Cell Receptor); TLR=Tollusličan receptor (TLR, engl. Toll-like receptors); RAGE=receptor za krajnje produkte uznapredovale glikozilacije (RAGE, engl. receptor for advanced glycation end products); TNF=čimbenik nekroze tumora (TNF, engl. tumor necrosis factor); INF-γ=interferon-γ (prilagođeno prema referenci br. 4).

inhibira HMGB1, ali ne i otpuštanje TNF iz aktiviranih makrofaga. Mala studija sistemske blokade TNF infuzijama infliksimaba u bolesnika s RA nije pokazala nikakve promjene u pojavljivanju HMGB1 u sinoviji. To može ukazivati na to da TNF nije glavni pokretač izvanstaničnog HMGB1 tijekom reumatoidnog sinovitisa (65). Najjače indicije koje govore o važnosti uloge HMGB1 u patogenezi artritisa temelje se na rezultatima dobivenim na životinjskim modelima koji koriste niz različitih eksperimentalnih strategija kako bi smanjili upalu posredovanu HMGB1. Mnogi odvojeni terapijski modaliteti koji neutraliziraju aktivnost izvanstaničnog HMGB1 ili njegovih receptora ili otpuštanja izvanstaničnog HMGB1 uspješno su primijenjeni u različitim modelima artritisa.

Nadalje, rezultati Kokkole i sur. (2003.) sugeriraju da intervencija neutralizirajućim poliklonskim anti-HMGB1 protutijelima sprečava napredovanje postojećeg artritisa u glodavaca, smanjujući kliničke znakove artritisa i gubitak tjelesne težine (68). Važno je napomenuti da se neutraliziranjem HMGB1 također stječe značajna zaštita hrskavice i kosti zgloba od destrukcije koja je glavni uzrok kroničnog invaliditeta u te bolesti (69,70). Liječenje smanjuje pojavnost TNF i IL-1 $\beta$  i histološke znakove upale. Važno pitanje u procesu proizvodnje monoklonskog protutijela na HMGB1 jest kako smanjiti oslobađanje endogenog HMGB1 iz hibridnih stanica koji bi mogao blokirati vezna mjesta za protutijela. Naime, u uvjetima kulture sa stresom, hipoksijom ili nekrozom hibridoma, stanice će otpustiti HMGB1 kojeg će prepoznati anti-HMGB1 monoklonska antitijela i time smanjiti njihovu učinkovitost liječenja.

Još jedan uspješan način inhibiranja aktivnosti HMGB1 u artritisu temelji se na primjeni tzv. A-domene rekombinantnog proteina HMGB1. Analize strukture i funkcije molekule HMGB1 pokazale su da DNA-vezujuća B-domena posreduje proupalne učinke HMGB1, dok je DNA-vezujuća A-domena protuupalna molekula. Domena A inhibira ove aktivnosti premještanjem membranskog HMGB1 receptora na stanicama (15). Sistemska primjena HMGB1 A-domene u glodavaca s artritisom značajno poboljšava artritis „score“, smanjuje gubitak tjelesne težine uzrokovan bolešću i popravljiva histološki nalaz u miševa i štakora (71). Pojavnost IL-1 $\beta$  u sinoviji i destrukcija zglobne hrskavice također je značajno smanjena u životinja tretiranih A-domenom.

Trombomodulin (TM) je endotelni antikoagulantni kofaktor koji promiče stvaranje aktiviranog proteina C posredovano trombinom, aktivnost HMGB1 neutralizirana je vezivanjem na N-terminalni lektinsku domenu TM-a, dijela molekule koji ne sudjeluje u procesima zgrušavanja (72). Nadalje, miševi kojima nedostaje lektinunalik domena TM-a razvijaju teži oblik artritisa i artritis



s bržim nastupom nego divlji kontrolni tip miševa.

Zaključno, jasna je potreba za novim istraživanjima na tom području, ali opće je vjerovanje da će se usmjeravanje interesa na alarmine pokazati korisnim. Očekuje se da će uvođenje novih strategija liječenja, kao što je blokada proteina HMGB1, pokazati alarmine terapijskim metama koje će omogućiti dugoročnu remisiju u bolesnika s upalnim reumatskim bolestima

## Izjava o sukobu interesa

Autori izjavljuju da nemaju sukob interesa.

## Literatura:

1. Bobek D, Grčević D, Kovačić N, et al. The presence of high mobility group box-1 and soluble receptor for advanced glycation end-products in juvenile idiopathic arthritis and juvenile systemic lupus erythematosus. *Pediatr Rheumatol Online J.* 2014; 2:50.
2. Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol.* (Epub ahead of print) Feb 26, 2009.
3. Bianchi ME, Manfredi AA. High-mobility group box 1 (HMGB1) protein at the cross-roads between innate and adaptive immunity. *Immunol Rev.* 2007;220:35–46.
4. Chan JK, Roth J, Oppenheim JJ, et al. Alarmins: awaiting a clinical response. *The Journal of Clinical Investigation* 2012;8:2711-2719.
5. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol.* 2007;81:1–5.
6. Areschoug T, Gordon S. Pattern recognition receptors and their role in innate immunity: focus on microbial protein ligands. *Contrib. Microbiol.* 2008;15:45-60.
7. Odink K, Cerletti N, Brügger J, et al. Two calcium-binding proteins in infiltrate macrophages of rheumatoid arthritis. *Nature.* 1987;330:80-2.
8. Urbonaviciute V, Fürnrohr BG, Meister S. et al. Induction of inflammatory and immune responses by HMGB1-nucleosome complexes: implications for the pathogenesis of SLE. *J Exp Med.* 2008;205:3007-3018.
9. Soyfoo MS, Roth J, Vogl T, et al. Phagocyte specific S100A8/A9 protein levels during disease exacerbations and infections in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatology.* 2009;36(10):2190-4.
10. Portela LVC, Brenol JCT, Walz R, et al. Serum S100B levels in patients with lupus erythematosus: preliminary observation. *Clinical diagnostic labor immunol.* 2002;9(1):164–166.

11. Popović K, Ek M, Espinosa A, et al. Increased expression of the novel proinflammatory cytokine high mobility group box chromosomal protein 1 in skin lesions of patients with lupus erythematosus. *Arth Rheum.* 2005;52:3639–3645.
12. Wittkowski H, Hirono K, Ichida F, et al. Acute Kawasaki disease is associated with reverse regulation of soluble receptor for advanced glycation end products and its proinflammatory ligand S100A12. *Arth Rheum.* 2007;56(12):4174-4181.
13. Ulfgren AK, Grundtman C, Borg K, et al. Down-regulation of the aberrant expression of the inflammation mediator high mobility group box chromosomal protein 1 in muscle tissue of patients with polymyositis and dermatomyositis treated with corticosteroids. *Arth Rheum.* 2004;50:1586–1594.
14. Ek M, Popović K, Harris HE, et al. Increased extracellular levels of the novel proinflammatory cytokine high mobility group box chromosomal protein 1 in minor salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *Arth Rheum.* 2006;54:2289–2294.
15. Yang H, Ochani M, Li J, et al. Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(1):296-301.
16. Porto A, Palumbo R, Pieroni M, Aprigliano G, Chiesa R, Sanvito F, Maseri A, Bianchini ME. Smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques secrete and proliferate in response to high mobility group box 1 protein. *FASEB J.* 2006;20(14): 2565-6.
17. Zenz R, Eferl R, Kenner L, Florin L, Hummerich L, Mehic D, Scheuch H, Angel P, Tschachler E, Wagner EF. Psoriasis-like skin disease and arthritis caused by inducible epidermal deletion of Jun proteins. *Nature.* 2005;437(7057):369-75.
18. Yang D, Tewary P, de la Rosa G, Wei F, Oppenheim JJ. The alarmin functions of high-mobility group proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1799(1–2):157–163.
19. Dumitriu IE, 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(12):7506–7515.
20. Yang D, Chen Q, Yang H, Tracey KJ, Bustin M, Oppenheim JJ. High mobility group box-1 protein induces the migration and activation of human dendritic cells and acts as an alarmin. *J Leukoc Biol.* 2007;81(1):59–66.
21. Frosch M, et al. Myeloid-related proteins 8 and 14 are specifically secreted during interaction of phagocytes and activated endothelium and are useful markers for monitoring disease activity in pauciarticular-onset juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000;43(3):628–637.
22. Frosch M, Roth J. New insights in systemic juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 2008;47:121-125.
23. Foell D, Roth J. Proinflammatory S100 proteins in arthritis and autoimmune disease. *Arthritis Rheum.* 2004;50:3762-3771.
24. van Lent PL, et al. Myeloid-related proteins S100A8/S100A9 regulate joint inflammation and cartilage destruction during antigen-induced arthritis. *Ann Rheum Dis.*

2008;67(12):1750–1758.

25. van Lent PL, et al. Stimulation of chondrocyte-mediated cartilage destruction by S100A8 in experimental murine arthritis. *Arthritis Rheum.* 2008;58(12):3776–3787.
26. Urbonaviciute V, Voll RE. HMGB1 in SLE. *J Intern Med* 2011;270.
27. Barkauskaite V, EkM, Popovic K, Harris HE, Wahren-Herlenius M, Nyberg F. Translocation of the novel cytokine HMGB1 to the cytoplasm and extracellular space coincides with the peak of clinical activity in experimentally UV-induced lesions of cutaneous lupus erythematosus. *Lupus* 2007;16:794–802.
28. Jiang W, Pisetsky DS. Expression of high mobility group protein 1 in the sera of patients and mice with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2008;67:727–8.
29. Bruchfeld A, Qureshi AR, Lindholm B et al. High Mobility Group Box Protein-1 correlates with renal function in chronic kidney disease. *Mol Med* 2008;14:109–15.
30. 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.
31. 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.
32. Ma CY, Jiao YL, Zhang J 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* 2010 (Epub ahead of print).
33. Urbonaviciute V, Furnrohr BG, Weber C et al. Factors masking HMGB1 in human serum and plasma. *J Leukoc Biol* 2007; 81:67–74.
34. 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.
35. Andersson U, Rauvala H. Introduction: HMGB1 in inflammation and innate immunity. *Journal of Internal Medicine* 2011;270:296–300.
36. Yanai H, Ban T, Taniguchi T. HMGB proteins in nucleic acid-mediated innate immune responses. *J Intern Med* 2011;270.
37. 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.
38. Yang H, Hreggvidsdottir HS, Palmblad K et al. A critical cysteine is required for HMGB1 binding to toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:11942–7.
39. Antoine DJ, Williams DP, Kipar A, Laverty H, Park BK. Diet restriction inhibits apoptosis and HMGB1 oxidation and promotes inflammatory cell recruitment during ac-

- etaminophen hepatotoxicity. *MolMed* 2010;16:479–90.
40. Atkinson AJ, Colburn WA, DeGruttola VG, DeMets DL, Downing GJ, et al. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;69(3):89–95.
  41. Claus RA, Otto GP, Deigner HP, Bauer M. Approaching clinical reality: markers for monitoring systemic inflammation and sepsis. *Curr Mol Med.* 2010;10(2):227–235.
  42. Mease PJ. The potential roles for novel biomarkers in rheumatoid arthritis assessment. *Clin Exp Rheumatol.* 2011;29(3):567–574.
  43. Hammer HB, et al. Calprotectin (a major leucocyte protein) is strongly and independently correlated with joint inflammation and damage in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2007;66(8):1093–1097.
  44. Brun JG, Jonsson R, Haga HJ. Measurement of plasma calprotectin as an indicator of arthritis and disease activity in patients with inflammatory rheumatic diseases. *J Rheumatol.* 1994;21(4):733–738.
  45. Kane D, Roth J, Frosch M, Vogl T, Bresnihan B, FitzGerald O. Increased perivascular synovial membrane expression of myeloid-related proteins in psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003;48(6):1676–1685.
  46. Foell D, Ichida F, Vogl T, et al., "S100A12 (EN-RAGE) in monitoring Kawasaki disease," *The Lancet*, 2003;361:1270–1272.
  47. Foell D, Frosch M, Schulze zur Wiesch A, Vogl T, Sorg C, Roth J. Methotrexate treatment in juvenile idiopathic arthritis: when is the right time to stop? *Ann Rheum Dis.* 2004;63(2):206–208.
  48. Foell D, et al. Methotrexate withdrawal at 6 vs 12 months in juvenile idiopathic arthritis in remission: a randomized clinical trial. *JAMA.* 2010;303(13):1266–1273.
  49. Liao H, et al. Use of mass spectrometry to identify protein biomarkers of disease severity in the synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004;50(12):3792–3803.
  50. Hammer HB, et al. Calprotectin (a major S100 leucocyte protein) predicts 10-year radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(1):150–154.
  51. Chavakis T, Bierhaus A, Nawroth PP. RAGE (receptor for advanced glycation end products): a central player in the inflammatory response. *Microbes Infect.* 2004;6:1219–1225.
  52. Bovin LF, Rieneck K, Workman C, et al. Blood cell gene expression profiling in rheumatoid arthritis. Discriminative genes and effect of rheumatoid factor. *Immunol. Lett.*, 2004;93:217–226.
  53. Sunahori K, Yamamura M, Yamana J, et al. The S100A8/A9 heterodimer amplifies proinflammatory cytokine production by macrophages via activation of nuclear fac-

tor kappa B p38 mitogen-activated protein kinase in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.*, 2006;8:69.

54. de Seny D, Fillet M, Ribbens C, et al. Monomeric calgranulin measured by SELDI-TOF mass spectrometry and calprotectin measured by ELISA as biomarkers in arthritis. *Clin. Chem.* 2008;54:1066-1075.
55. Wittkowski H, Foell D, af Klint E, et al. Effects of intra-articular corticosteroids and anti-TNF therapy on neutrophil activation in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2007;66:1020-1025.
56. Taniguchi N, Kawahara K, Yone K, 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;48:971-981.
57. Kaiser T, Langhorst J, Wittkowski H, et al., "Faecal S100A12 as a non-invasive marker distinguishing inflammatory bowel disease from irritable bowel syndrome," *Gut*, 2007;56(12):1706-1713.
58. Foell D, Wittkowski H, and Roth J, "Monitoring disease activity by stool analyses: from occult blood to molecular markers of intestinal inflammation and damage," 2009;58(6):859-868.
59. Foell D, Kane D, Bresnihan B, et al., "Expression of the proinflammatory protein S100A12 (EN-RAGE) in rheumatoid and psoriatic arthritis," *Rheumatology*, 2003;42(11):1383-1389.
60. Wittkowski H, Frosch M, Wulffraat N, Goldbach-Mansky R, Kallinich T, Kuemmerle-Deschner J, et al. S100A12 Is a Novel Molecular Marker Differentiating Systemic-Onset Juvenile Idiopathic Arthritis From Other Causes of Fever of Unknown Origin. *American College of Rheumatology.* 2008;58:3924-3931.
61. Taylor PC, Feldmann M. Anti-TNF biologic agents: still the therapy of choice for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2009;5(10):578-582.
62. Feldmann M, Maini RN. Lasker Clinical Medical Research Award. TNF defined as a therapeutic target for rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Nat Med.* 2003;9(10):1245-1250.
63. Reinhart K, Karzai W. Anti-tumor necrosis factor therapy in sepsis: update on clinical trials and lessons learned. *Crit Care Med.* 2001;29(7):121-125.
64. Pullerits R, Jonsson IM, Kollias G, Tarkowski A. Induction of arthritis by high mobility group box chromosomal protein 1 is independent of tumour necrosis factor signaling. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(3):R72.
65. Sundberg E, Grundtman C, Af Klint E, et al. Systemic TNF blockade does not modulate synovial expression of the pro-inflammatory mediator HMGB1 in rheumatoid arthritis patients-a prospective clinical study, *Arthritis Res. Ther.* 2008;10(2):33.
66. Ostberg T, et al. Protective targeting of high mobility group box chromosomal protein 1 in a spontaneous arthritis model. *Arthritis Rheum.* 2010;2(10):2963-2972.

67. Yamoah K, Brebene A, Baliram R, et al. High-mobility group box proteins modulate tumor necrosis factor- $\alpha$  expression in osteoclastogenesis via a novel deoxyribonucleic acid sequence, *Mol. Endocrinol.* 2008;22:1141–1153.
68. Kokkola R, Li J, Sundberg E, Aveberger AC, Palmblad K, et al. Successful therapy in collagen-induced arthritis in mice and rats targeting extracellular HMGB1 activity, *Arthritis Rheum.* 2003;48:2052–2058.
69. Östberg T, Wähämaa H, Palmblad K, et al. Oxaliplatin retains HMGB1 intranuclearly and ameliorates collagen type II-induced arthritis, *Arthritis Res. Ther.* 2008;10:1.
70. Hofmann MA, Drury S, Fu C, et al. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides, *Cell* 1999;97:889–901.
71. Kokkola R, Li J, Sundberg E, et al. Successful therapy in collagen-induced arthritis in mice and rats targeting extracellular HMGB1 activity, *Arthritis Rheum.* 2003;48(7):2052–2058.
72. Abeyama K, Stern DM, Ito Y, et al. The N-terminal domain of thrombomodulin sequesters high-mobility group-B1 protein, a novel antiinflammatory mechanism, *J. Clin. Invest.* 2005;115:1267–1274.