



**Nathalie Niyonzima**

Bioingeniør og molekylærbiolog med PhD, forsker ved Senter for molekylær inflammasjonsforskning (CEMIR), Norges naturvitenskapelige universitet (NTNU)  
E-post: nathalie.niyonzima@ntnu.no

# Komplementsystemets rolle i aterosklerose

**Komplementsystemet har en nøkkelrolle i kolesterolkrystallindusert inflammasjon i aterosklerose. Studier fra NTNU, Senter for molekylær inflammasjonsforskning (CEMIR), har vist hvordan kolesterolkrystaller gir en inflammatorisk respons i arterieveggen. Denne responsen er avhengig av både systemisk og intracellulær komplementaktivering.**

## **Aterosklerose og dannelse av kolesterolkrystaller**

Hjerte- og karsykdommer forårsaker globalt 17,9 millioner dødsfall per år, og var med dette den ledende dødsårsak i verden i 2019 (1, 2). De vanligste formene er koronar hjertesykdom (*angina pectoris* og hjerteinfarkt) og cerebrovaskulær sykdom (hjernerdrypp, hjerneslag og hjerneblødning). Den underliggende årsaken for disse tilstandene er aterosklerose, en lidelse som utvikler seg tregt og resulterer i dannelsen av en kronisk betennelse i åreveggen. Over tid kan dette bli livstruende.

Fra å være identifisert som en feil ved kolesterollagring, er nå aterosklerose anerkjent som en sykdom som skyldes en kronisk betennelse (3). Kunnskapen om bidraget fra immunforsvaret i aterosklerose, fra dannelse av aterosklerotiske plakk til destabiliseringen av eksisterende plakk som fører til blodpropp, er stadig økende. Men hva som starter betennelsen i åreveggen er imidlertid ikke godt beskrevet. Kolesterol som akkumuleres i aterosklerotiske plakk, i

form av kolesterolester i skumceller eller som utfelte kolesterolkrystaller (CC), kan starte utvikling og progresjon av sykdommen (4). Man finner CC i alle fasene av aterosklerose, og krystallene setter fart i betennelsen man ser i utviklingen av sykdommen. Kroppen identifiserer CC som skadelige stoffer. Våre forsvarsceller, kalt makrofager, klarer ikke å bryte ned og rydde vekk disse CC. I stedet setter makrofagene i gang en betennelse når de prøver å fjerne CC.

## **CC i aterosklerose**

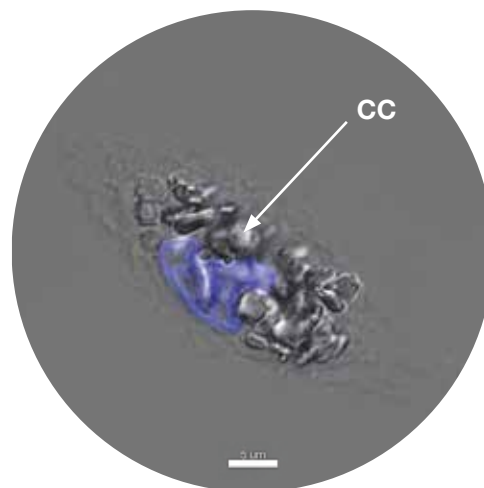
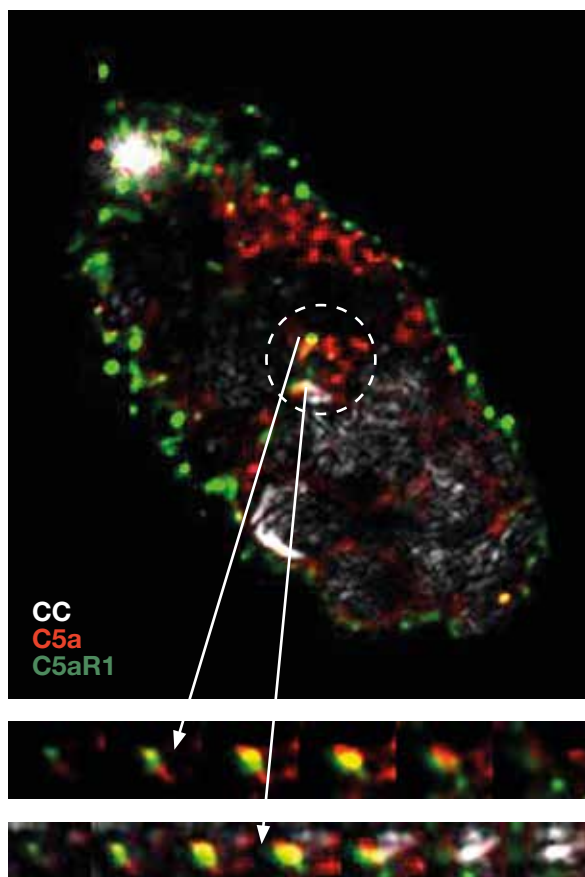
CC er en viktig bidragsyter tidlig i ateroskrogenesen som gir en kraftig immunrespons. Via aktivering av det intracellulære proteinkomplekset kalt inflammasom (NLRP3) blir interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) frigjort (4) (se faktaboks). IL-1 $\beta$  er et potent cytokin som driver immunresponsen videre. CC er også til stede i plakk hos mennesker (5-7). Selektivhemming av IL-1 $\beta$  for å forhindre koronare hendelser har allerede vært i klinisk utprøving. Resultater etter behandling med medikamentet Canakinumab

(humant monoklonalt antistoff rettet mot IL-1 $\beta$ ) viste reduserte betennelsesreaksjoner hos pasienter med hjerteinfarkt, og det reduserte også tilbakevendende kardiovaskulære hendelser, sammenlignet med placebo (8).

## **Komplementsystemet**

Komplementsystemet er en viktig del av det medfødte immunsystemet som umiddelbart registrerer fremmede inntrængere. Hovedoppgaven er en rask gjenkjenning av fremmede strukturer, som for eksempel mikrober eller strukturer som eksponeres i skadet vev (9). I tillegg vil komplementsystemet gjenkjenne strukturer som dannes ved såkalt steril inflammasjon, altså inflammasjon som er forårsaket av krystaller ved utfelling av kolesterol i aterosklerose eller av urinsyre i leddgikt. Ved bakterielle infeksjoner bidrar komplementsystemet blant annet til opsonisering, kjemotakse og bakteriedrap. I normal tilstand er komplementsystemet kroppens forsvarsvenn, men det kan skade organer og eventuelt bidra til en kronisk tilstand som aterosklerose når det kommer ut av kontroll.

Komplementproteiner har tradisjonelt blitt definert som plasmaproteiner. De siste årene har en rekke oppdagelser vist at komplementsystemet er ett av immunsystemets viktigste forsvarsverk. Det finnes både på utsiden og inne i immunceller (10-13). Forskning viser at funksjonen til de ulike komplementproteinene defineres av deres lokalisasjon. For eksempel ►



**FIGUR 1. Konfokal laserskanning fluorescens.** Mikroskopibilder av human makrofag. Bildene viser blant annet en human makrofag som har tatt opp kolesterolkrystaller (CC) (bildet øverst til høyre med cellekjerne farget blått og CC i hvitgrå). I bildet øverst til venstre viser hvit farge CC, grønn farge komplement C5aR1, mens rød farge viser C5a. De to nederste bildene viser en forstørrelse av området som er innringet. Gul farge viser at C5a og C5aR1 kolokaliserer.

vil komplementproteiner i plasma fungere forskjellig, sammenlignet med de samme proteinene på innsida av celler.

Ved CEMIR har vi sett nærmere på mekanismene som ligger bak CC-indusert betennelse i aterosklerose. I de neste delkapitlene drøfter jeg arbeid som er gjort på CEMIR for å studere komplementsystemets bidrag i CC-indusert betennelse, arbeid som har økt kunnskap om CC-betennelsesreaksjoner i aterosklerose.

### Ekstracellulært komplement fasiler fagocytose av CC

I en studie vi gjorde i 2014, så vi at ekstracellulære komplementproteiner var viktige i CC-indusert betennelse i aterosklerose (14). Vi benyttet oss av en human fullblodsmodell, der alle blodets bestanddeler var til stede og kunne påvirke hverandre. Blodet ble inkubert med CC, og vi fant ut at CC aktiverer komplementsystemet og dermed klargjør inflammaso-

met NLRP3 for aktivering. Videre så vi at komplementsystemet er viktig for opsonisering og fagocytose av CC. I denne studien brukte vi blod fra en pasient med en sjelden genetisk defekt der komplement 5 (C5) mangler helt (15). Denne delen av komplementsystemet er viktig for å danne sluttproduktet C5b-9, som fører til bakteriedrap. Sammenlignet med blod fra friske, kunne vi kartlegge at C5 var viktig i den inflammatoriske responsen til CC. I tillegg brukte vi hemmere av deler av komplementsystemet, som førte til at opptak av CC – og dermed produksjonen av en rekke cytokiner – blir redusert, inkludert IL-1 $\beta$  (14).

### Celleproduserte komplementproteiner

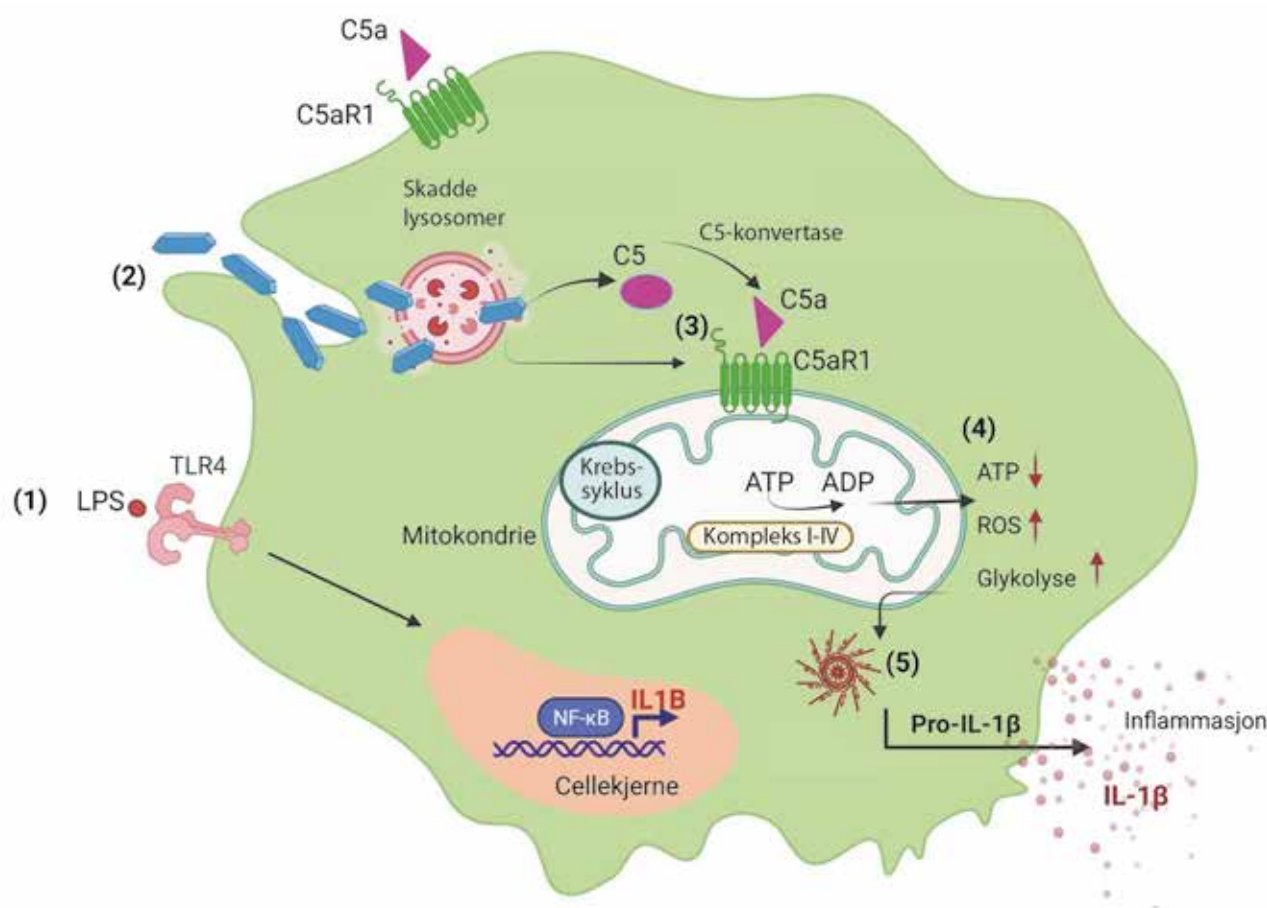
#### Betydning i plakk

Celler i plakk produserer og uttrykker komplementproteiner, både på mRNA- og proteinnivå (16). Komplementproteiner er uttrykt i celler fra både stabile og ustabile plakk. Ved CEMIR har vi nylig vist at noen av disse proteinene lokaliseres rundt CC i plakk, særlig i områder med nekrose (17). I dette arbeidet benyttet vi

### FAKTA | Ordforklaring

- **Inflammasom:** Multiproteinkompleks i immunsystemet som fungerer som reseptor og sensor av mikrobiell infeksjon, molekyler derivert fra proteiner, eller strukturer som eksponeres i skadet vev. Inflammasom trigger inflammasjon ved å aktivere caspase-1 og inflammasjon.
- **Interleukin-1 $\beta$ :** Proinflammatorisk cytokin som skiller ut etter infeksjon, mikrobielle toksiner eller inflammatoriske triggere. IL-1 $\beta$  spiller en viktig rolle ved immunologiske og inflammatoriske tilstander og ved feber.

- **Opsonisering:** Binding av opsonin til en mikroorganisme (bakterie, virus, og lignende), slik at den tas opp mer effektivt av en fagocytt.
- **LPS:** Lipopolysakkarid
- **NLRP3:** En type cytosoliske NOD-liknende (NOD: nukleotidbindende oligomeriserende domene) reseptorer, med det fellestrekk at de er intracellulære sensorer for fare og stress. NLRP3 medierer prosesseringen av interleukin-1 $\beta$ .
- **ROS:** Reaktive oksygensubstanser
- **TLR4:** Toll-lik reseptor 4



**FIGUR 2:** Skjematisk fremstilling av hva som skjer i makrofagen som har tatt opp kolesterolkrystaller (CC).

Makrofager uttrykker intracellulær komplement C5aR1 på mitokondrier i cellen. C5 spaltes til C5a ved hjelp av enzymet C5-konvertase. (1) Signal 1 er indusert når TLR4-aktivering fører til transkripsjon av gen for IL-1β. (2) Signal 2 er indusert av CC vist med blå symboler. Opptak av CC øker intracellulær C5a og (3) trigger aktiveringen av C5aR1 på mitokondriet. (4) Aktiveringen av mitokondrie-C5aR1 påvirker mitokondriefunksjonen ved å redusere produksjonen av ATP, mens det øker dannelse av ROS og økt glykolyse som makrofager bruker som energikilde. (5) Dette trigger inflammasom-NLRP3-komplekset og spaltning av pro-IL-1β til sekresjon av IL-1β.

oss av perifere mononukleære blodceller (PBMC) og karotiplakk fra pasienter med forskjellige grader av aterosklerose. Vi studerte betennelse ved hjelp av forskjellige analysemetoder, inkludert ELISA, immunhistokjemi, konfokal mikroskopi og helgenomsekvensering.

Vi fant at komplementproteiner var sterkt uttrykt i plasma fra pasienter med både stabile og ustabile plakk, sammenlignet med plasma fra friske personer. Dette tyder på økt systemisk betennelse i begge pasientgruppene. I karotiplakk akkumulerte komplement C1q og C5b-9 rundt CC, og det var økt genuttrykk av komplementreseptorene; C3aR, C5aR1 og C5aR2 fra karotiplakk fra pasienter med akutt koronart syndrom. Dette tyder på at lokalt komplement (produsert av cel-

lene) i plakk er driver av aterosklerose. Det kan tenkes at bindingen av komplement på CC i plakk kan fungere som kjemotakse som tiltrekker flere immunceller til CC i plakk, og dermed vekst av plakk. Dette arbeidet demonstrerte en positiv korrelasjon mellom CC-aktivering av komplementsystemet i aterosklerotisk plakk med alvorlighetsgrad av aterosklerose (17).

#### Betydning på innsiden av celler

I arbeidet vårt som ble publisert i *Science Immunology* (18) benyttet vi oss av isolerte makrofager fra blod fra friske frivillige givere, samt musemodeller og plakk fra pasienter, for å studere betennelse i aterosklerose. Når vi tilførte CC til makrofager, så vi at intracellulært

komplement C5a og reseptor C5aR1 ble aktivert, og at disse proteinene kolo-kaliserte i makrofager (Figur 1). Vi så at dette utløste en betennelsesreaksjon ved at makrofagene startet å lage det potente cytokinet IL-1β, som er vist å akselerere utviklingen av aterosklerose. Ved å hemme det intracellulære komplementsystemet kunne betennelsesreaksjonen i makrofagene dempes. I dette arbeidet oppdaget vi at komplementreseptoren C5aR1 sitter på mitokondriene. Når makrofagene tok opp CC ble komplementreseptoren på mitokondriene aktivert og utløste produksjon av betennelsesfremmende reaktive oksygenforbindelser (ROS), samt økning i ATP og glykolyse for å forsyne makrofagene med energi. Våre funn tyder på at C5aR1

på mitokondriene fungerer som et alarm-system som oppdager CC, og setter i gang produksjon av IL-1 $\beta$  og betennelse i aterosklerose.

For å bekrefte vårt funn etablerte vi en musemodell for aterosklerose, der genene for C5aR1 eller C5 var modifisert kun i makrofager, men ikke i andre immunceller. Vi fant ut at fjerning av C5aR1-genet reduserte størrelse og grad av betennelse i aterosklerotiske plakk. I tilførte også hemmere av intracellulær C5aR1 til plakk fra pasienter med aterosklerose, og dette reduserte den generelle betennelsen i plakkene betydelig. I samme studie fant vi at genetisk modifisert C5 eller C5aR1 i makrofager også beskyttet mus mot nyresvikt. Denne studien viser at det intracellulære komplementsystemet er en viktig faktor i den biologiske prosessen som fører til steril betennelse som oppstår i aterosklerose (Figur 2). Vårt arbeid peker også på muligheten av å benytte hemmere av intracellulært komplement for behandling av aterosklerose.

### Konklusjon

Studier har vist at systemisk og intracellulært komplementaktivering står sentralt i CC-indusert betennelse i aterosklerose. Mens ekstracellulært komplement er viktig for fagocytose av CC med en gang makrofager har tatt opp CC, så er det intracellulært komplement C5aR1 på mitokondriene som oppdager CC og setter i gang en kaskade som utløser produksjon av potente cytokin IL-1 $\beta$ . Resultatene er viktige for å forstå mekanismer bak atherogenese, og understreker betydningen av å hemme intracellulært komplement C5aR1-akse i steril inflammasjon. ■

### Referanser

- World Health Organization. Global status report on noncommunicable diseases 2014. Geneva, Switzerland: WHO; 2014.
- GBD 2016 Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet*. 2017;390(10100):1151-1210.
- Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(7):508-19.
- Duwell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature*. 2010;464(7293):1357-61.
- Abela GS, Aziz K, Vedre A, Pathak DR, Talbott JD, Dejong J. Effect of cholesterol crystals on plaques and intima in arteries of patients with acute coronary and cerebrovascular syndromes. *Am J Cardiol*. 2009;103(7):959-68.
- Abela GS, Aziz K. Cholesterol crystals cause mechanical damage to biological membranes: a proposed mechanism of plaque rupture and erosion leading to arterial thrombosis. *Clin Cardiol*. 2005;28(9):413-20.
- Abela GS. Cholesterol crystals piercing the arterial plaque and intima trigger local and systemic inflammation. *J Clin Lipidol*. 2010;4(3):156-64.
- Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, et al. Antiinflammatory therapy with Canakinumab for atherosclerotic disease. *N Engl J Med*. 2017;377(12):1119-31.
- Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol*. 2010;11(9):785-97.
- Liszewski MK, Kolev M, Le Friec G, Leung M, Bertram PG, Fara AF, et al. Intracellular complement activation sustains T cell homeostasis and mediates effector differentiation. *Immunity*. 2013;39(6):1143-57.
- Kolev M, Le Friec G, Kemper C. Complement-tapping into new sites and effector systems. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(12):811-20.
- West EE, Kunz N, Kemper C. Complement and human T cell metabolism: Location, location, location. *Immunol Rev*. 2020;295(1):68-81.
- West EE, Afzali B, Kemper C. Unexpected roles for intracellular complement in the regulation of Th1 responses. *Adv Immunol*. 2018;138:35-70.
- Samstad EO, Niyonzima N, Nymo S, Aune MH, Ryan L, Bakke SS, et al. Cholesterol crystals induce complement-dependent inflammasome activation and cytokine release. *J Immunol*. 2014;192(6):2837-45.
- Lappégard KT, Christiansen D, Pharo A, Thorgersen EB, Hellerud BC, Lindstad J, et al. Human genetic deficiencies reveal the roles of complement in the inflammatory network: lessons from nature. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(37):15861-6.
- Yasojima K, Schwab C, McGeer EG, McGeer PL. Generation of C-reactive protein and complement components in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol*. 2001;158(3):1039-51.
- Niyonzima N, Bakke SS, Gregersen I, Holm S, Sandanger Ø, Orrem HL, et al. Cholesterol crystals use complement to increase NLRP3 signaling pathways in coronary and carotid atherosclerosis. *EBioMedicine*. 2020;60:102985.
- Niyonzima N, Rahman J, Kunz N, West EE, Freiwald T, Desai JV, et al. Mitochondrial C5aR1 activity in macrophages controls IL-1 $\beta$  production underlying sterile inflammation. *Sci Immunol*. 2021;6(66):eabf2489.

# «Den er en

Å formidle handler om å røre noe i mottakeren, noe som gjør at budskapet forstås og som inspirerer til handling. Boken *Anti-biotika – helt og antihelt* – leverer på alle punkter!

Av Hege Smith Tunsjø

Forsteamanuensis ved bioingeniørutdanningen, OsloMet

Boken er en blanding av lærebok og tegneserie og handler om antibiotikas livreddende egenskaper og om farene ved overforbruk. Den er en fornøyelse å lese; humoristisk, men med alvorlige undertoner. Forfatter Øystein Runde har tatt i bruk dialog som virkemiddel. Professor og ekspert Dag Berild medvirker som både kilde og tegneseriefigur, sammen med Runde. Det er karakterene og tegningene som gjør boka genial – de er både morsomme og troverdige. Øystein Runde, som har en tilsvarende suksess bak seg med boken «Stamceller», ser ut til å ha funnet oppskriften på hvordan man formidler kompliserte temaer fra biologiens verden.

### Faktadelen/læreboken

Første del av boken tar oss gjennom historiske hendelser som oppdagelsen av penicillin, og gir leseren en forståelse for hvorfor resistens- og forsvarsmekanismer eksisterer hos mikroorganismer. Med visuelle virkemidler og humor gir forfatteren en enkel fremstilling av hvordan antibiotika virker mot bakterier, og bakterienes respons for å overleve. For å holde leserens interesse filtreres det vekk detaljer som fort kan bli for tunge, uten at viktige poenger går tapt. Språket er svært enkelt, noe som faktisk er krevende å få til. Et godt eksempel er seansen om horisontal genoverføring hos bakterier, et fenomen som er avgjørende for den