

REVISION BIBLIOGRAFIA**Fibrinógeno $\gamma A/\gamma'$ (gamma A/gamma Prima) características, propiedades y su posible rol en el desarrollo de trastornos cardiovasculares**

Oscar Castillo Baquero ¹, Andreína Rivas Meléndez ², Horacio Ávila Ulloa ³.

¹Departamento de Ciencias Morfofisiológicas de la Escuela de Bioanálisis de la Universidad de Carabobo, Sede Aragua.

² Departamento de Ciencias. Morfofisiológicas de la Escuela de Bioanálisis de la Universidad de Carabobo, Sede Aragua.

³ Departamento de Física Química Matemática de la Escuela de Bioanálisis de la Universidad de Carabobo, Sede Aragua.

Correspondencia: O. Castillo

E-mail: castillo_oscarj@yahoo.es

Recibido: Mayo 2008

Aprobado: Diciembre 2008

RESUMEN

El fibrinógeno A/ γ' (gamma A/gamma Prima) es una isoforma que resulta del procesamiento alternativo del ARNm que codifica para la cadena γ del fibrinógeno. Esta variante constituye entre el 8-15% del fibrinógeno plasmático circulante y la misma presenta una serie de propiedades bioquímicas y fisiológicas particulares que la diferencian del fibrinógeno $\gamma A/\gamma A$, la isoforma predominante de la circulación. El fibrinógeno $\gamma A/\gamma'$ sirve de transportador del Factor XIII de la coagulación e incrementa las concentraciones del mismo en el coágulo. Por ello está implicado en el grado de estabilización de la malla de fibrina y la resistencia a la fibrinólisis. Por otra parte $\gamma A/\gamma'$ presenta un sitio de alta afinidad capaz de fijarse al exosito II de la trombina y de esta manera inhibir a este importante factor de la coagulación, efecto conocido como Antitrombina I. Ciertos estudios clínicos revelan una asociación entre altos niveles de $\gamma A/\gamma'$ y enfermedad arterial coronaria. Sin embargo, investigaciones más recientes señalan que niveles bajos de esta isoforma del fibrinógeno están relacionados con enfermedad trombotica venosa posiblemente por la reducción de la actividad antitrombina.

Palabras clave: Fibrinógeno γ' , riesgo cardiovascular, fibrinólisis, antitrombina I

ABSTRACT

$\gamma A/\gamma'$ fibrinogen (gamma A/gamma Prima) - characteristics, and its possible role in the development of cardiovascular disorders

$\gamma A/\gamma'$ fibrinogen (gamma A/gamma Prime) isoform results from alternative splicing of fibrinogen mRNA. This variant constitutes 8% to 15% of plasma fibrinogen. Compared with $\gamma A/\gamma A$, $\gamma A/\gamma'$ fibrinogen has biochemical and physiological features. $\gamma A/\gamma'$ serves as carrier protein for Factor XIII in plasma and increases the local concentration of this factor in fibrin clots that are more extensively cross-linked by Factor XIII and are more resistant to fibrinolysis. On the other hand, $\gamma A/\gamma'$ contains a high affinity binding site for thrombin exosite II and inhibits this coagulation factor and is known as antithrombin I. Research has shown an association between high levels of $\gamma A/\gamma'$ and coronary artery disease. However, more recent studies reveal that low levels of this variant are related to thrombotic venous disease and this could be explained by a reduction of antithrombin I activity.

Key Words: γ' fibrinogen, cardiovascular risk, fibrinolysis, antithrombin I.

INTRODUCCIÓN

El fibrinógeno (Fg) es la molécula precursora de la fibrina, principal proteína del coágulo que se forma tras una lesión externa de un vaso sanguíneo y que persigue evitar la pérdida de sangre (1). Por otro lado la fibrina conjuntamente con plaquetas activadas constituyen los elementos preponderantes de los trombos originados luego de la ruptura de placas de ateroma (2). La trombosis trae como consecuencia la obstrucción del flujo sanguíneo y consecuentemente la aparición de fenómenos isquémicos que comprometen la salud y vida del individuo. En este orden de ideas se ha comprobado que altos niveles de Fg constituye un importante factor de riesgo cardiovascular (3,4) y esto puede ser explicado en parte debido al incremento de la agregabilidad plaquetaria (5), así como también de la viscosidad sanguínea (6) lo que promueve un estado de hipercoagulabilidad, donde la malla de fibrina formada es más difícil de degradar por el sistema fibrinolítico (7).

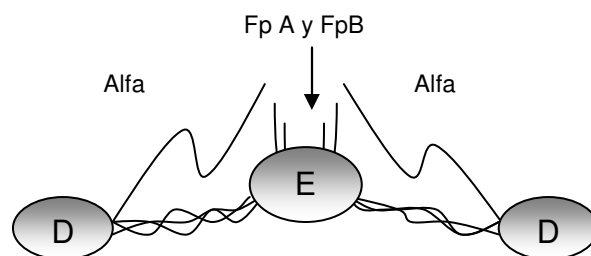


Fig.1. Representación esquemática de la estructura del Fg. Se aprecia el dominio globular central E, y los dominios D. Los dominios D y E están unidos por una región de α hélices superenroscadas. El extremo carboxiterminal de la cadena $A\alpha$ forma un cuarto dominio conocido como Alfa C.

La cadena $A\alpha$ presenta 610 aminoácidos. La cadena $B\beta$ presenta 461 residuos, y la cadena γ , presenta dos isoformas: la γA , con 411 residuos (8), y la γ' de 427 aminoácidos, la cual tiene una secuencia única luego de la posición 407 (11). Estas variantes pueden ensamblarse como homodímeros tipo $\gamma A/\gamma A$ (85%

del Fg total) o heterodímeros $\gamma A/\gamma'$ (15% del Fg total). Las cantidades de homodímeros γ'/γ' no supera el 1% (12).

Conversión de fibrinógeno a fibrina y ensamblaje: El Fg no polimeriza de manera espontánea debido a la repulsión de cargas de signo (-) de los extremos N-terminales de las cadenas $A\alpha$ y $B\beta$. La remoción de cortas secuencias peptídicas de éstas cadenas en las posiciones $A\alpha_{16Arg-17Gly}$ (fibrinopéptido A) y después $B\beta_{14Arg-15Gly}$ (fibrinopéptido B) por acción de la trombina permite que comience el proceso de asociación entre estas unidades ahora denominadas monómeros de fibrina (13). Se han descrito dos sitios de polimerización, E_A y E_B , luego de la acción de la trombina sobre el Fg. El E_A abarca la secuencia $A\alpha_{-17-20}$ (14). El sitio E_B comprende la secuencia $B\beta_{15-42}$ (15).

Formación de la malla de fibrina: La exposición del sitio E_A en el monómero de fibrina, hace que éste interactúe con otro monómero de fibrina en un segmento complementario en el dominio D comprendido entre $\gamma_{337-379}$ (16), de tal manera que éstos quedan de forma escalonada, creciendo en dirección axial y longitudinal. El crecimiento ocurre mediante asociaciones no covalentes entre los dominios D y E de los monómeros de fibrina (dirección axial), y entre dominios D D de monómeros de fibrina contiguos como consecuencia de la asociación D E (crecimiento longitudinal). De esta manera se forma la primera unidad oligomérica de la malla de fibrina denominada protofibrilla, de un espesor equivalente a dos unidades de fibrina (17,18). Posteriormente la liberación de los Fibrinopéptidos B, produce la separación de los dominios αC próximos al dominio E, lo que permite la asociación lateral de las protofibrillas, para formar las fibras de fibrina (fig 2).

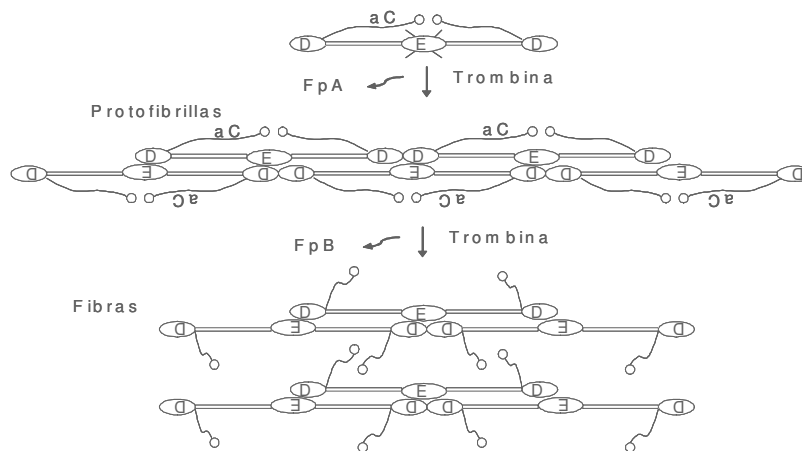


Figura 2: Diagrama esquemático de la polimerización de las moléculas de fibrina. Tomada de Molecular physiology and pathology of fibrin (Blood Rev. 2005;19(5):275-88) y modificada por los autores

La malla de fibrina formada *in vitro* a partir de Fg purificado, puede ser vista por diversas técnicas, entre ellas la microscopia confocal. Fig 3

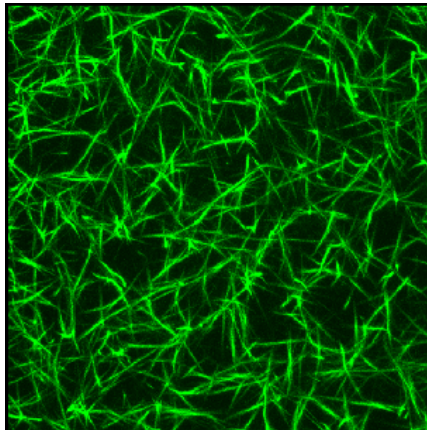


Fig. 3. Malla de fibrina obtenida *in vitro* a partir de fibrinógeno purificado. Técnica de microscopia confocal. Tomada por OCB en el laboratorio de Fisiología celular del Centro de Bioquímica y Biofísica del IVIC

Entrecruzamiento de la fibrina por el Factor XIII activado (FXIIIa): El FXIIIa cataliza la formación de enlaces covalentes intermoleculares entre residuos ϵ -(γ -glutamil) lisina (19). El proceso de entrecruzamiento es muy rápido entre las cadenas γ , dando lugar a la formación de dímeros γ , enlace que ocurre entre la lisina en posición 406 de una cadena γ y la glutamina en posición 398 o 399 de otra molécula (20,21). El entrecruzamiento de la cadena α es un proceso mucho más lento, y da lugar a polímeros α con diversos grados de entrecruzamiento, involucrando múltiples residuos lisina y glutamina presentes en las cadenas $A\alpha$ (22-24). El FXIII también puede entrecruzar las cadenas α y las cadenas γ , pero en un estadio posterior (24).

Degradación de la malla de fibrina: Una vez que el coágulo ha cumplido su función hemostática el mismo debe ser degradado con la finalidad de restablecer el flujo sanguíneo normal. La fibrinólisis es la disolución del coágulo sanguíneo debido a la acción de la Plasmina. Esta enzima proteolítica se forma a partir del precursor de origen hepático, llamado Plasminógeno. El activador tisular del Plasminógeno (t-PA) cataliza la conversión de plasminógeno a plasmina, pero para ello debe formarse un complejo ternario de Plasminógeno-tPA-Fibrina (25). El t-PA no es el único activador fisiológico del plasminógeno, existe otro, la Uroquinasa (u-PA), la cual tiene menos afinidad por la fibrina que el t-PA y es un activador efectivo tanto en presencia como en ausencia de fibrina (26,27). Las células endoteliales participan en la regulación de la fibrinólisis, secretando t-PA y el inhibidor del activador tisular del plasminógeno tipo 1 (PAI-1), que activan e inhiben el proceso respectivamente (28,29).

Fibrinógeno $\gamma A/\gamma'$ características y propiedades: El Fg $\gamma A/\gamma'$ fue identificado a principios de la década de los setenta (30), pero sus roles bioquímicos y fisiológicos permanecieron desconocidos hasta finales de la década de los noventa. El gen de la cadena γ contiene 10 exones y nueve intrones y durante

el procesamiento post-transcripcional, los intrones son eliminados y los exones se empalman para formar la porción del ARNm maduro que será traducido posteriormente como la cadena γ del fibrinógeno (31) conocido como γA . Sin embargo una fracción del transcripto primario sufre un procesamiento alternativo que conduce a la no eliminación del intrón 9, esto trae como consecuencia que los cuatro aminoácidos carboxiterminales de la cadena γ (AGDV) sean sustituidos por una secuencia de veinte aminoácidos distintos (VRPEHPAETEDSLYPEDDL), y de esta manera se forma la cadena γ' que forma parte del fibrinógeno $\gamma A/\gamma'$ (31,33) Figura 4. Esta extensión γ' protruye del dominio D del fibrinógeno y contiene dos sulfotirosinas (34), tres residuos ácido aspártico y cuatro ácido glutámico (35), que le confieren mayor cantidad de cargas negativas al fibrinógeno $\gamma A/\gamma'$ y le permite presentar sitios de fijación para el Factor XIII de la coagulación (36) y para la trombina (37). Por otra parte la cadena γ' no presenta sitio de fijación a la integrina plaquetaria $\alpha_{IIb}\beta_3$, glicoproteína que participa del proceso de agregación de las plaquetas (38).

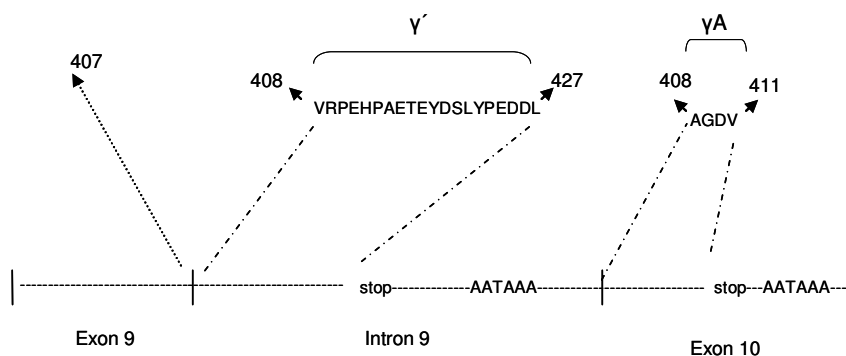


Fig.4. Codificación de la cadena γ' por parte del intrón 9 del gen de la cadena gamma.

La cadena γ' y la agregabilidad plaquetaria: El fibrinógeno participa de la agregación plaquetaria formando puentes entre las plaquetas activadas, a través de fijación a la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ (glicoproteína IIb-IIIa) (39) figura 5. La cadena γ del fibrinógeno contiene una secuencia de 12 aminoácidos en el extremo carboxiterminal que se fija a la integrina de la membrana plaquetaria $\alpha_{IIb}\beta_3$. La región más importante la constituyen una secuencia formada por los cinco últimos aminoácidos QAGDV los cuales no están presentes en la cadena γ' y por lo tanto esta isoforma no presenta este sitio de fijación a las plaquetas(40).

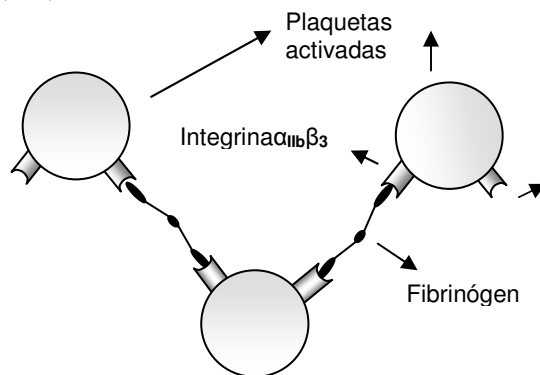


Fig. 5 Agregación plaquetaria y el rol del fibrinógeno dentro de este proceso

Fijación del Factor XIII y de la trombina al fibrinógeno $\gamma A/\gamma'$: El Fg $\gamma A/\gamma'$ es capaz de fijar al factor XIII de la coagulación (41). Existe un modelo que señala que el fibrinógeno $\gamma A/\gamma'$ inicialmente sirve de transportador plasmático del Factor XIII inactivo (42). Luego de la formación del coágulo y la activación del factor XIII por parte de la trombina, este se disocia de la cadena γ' dejando vacante el sitio para la fijación de la trombina. Estudios *in Vitro* han demostrado que el Fg $\gamma A/\gamma'$ incrementa las concentraciones locales de Factor XIII a nivel del coágulo y esto contribuye a una mayor estabilización del mismo por la formación de enlaces covalentes entre moléculas de fibrina (43), lo que confiere mayor resistencia a la lisis de estos coágulos de fibrina $\gamma A/\gamma'$ (44,45).

Por otro lado la isoforma $\gamma A/\gamma'$ contiene dos sitios de fijación para la trombina, uno de baja y otro de alta afinidad. El sitio de baja afinidad esta presente tanto en la variante mayor $\gamma A/\gamma A$ como en la variante menor $\gamma A/\gamma'$ y esta ubicado el dominio central E (46). El sitio de alta afinidad solo se encuentra en la isoforma $\gamma A/\gamma'$ (47-49). La fijación a este sitio de alta afinidad, secuestra trombina en la malla de fibrina e induce cambios alostéricos en el sitio catalítico de la enzima, lo cual reduce su actividad procoagulante y se constituye en un importante sistema inhibidor conocido como Antitrombina I (50,51).

Fibrinógeno $\gamma A/\gamma'$, estructura de la malla de fibrina y resistencia a la lisis:

Se han realizado estudios que demuestran características particulares de la malla de fibrina formada a partir de Fg $\gamma A/\gamma'$ sin embargo, los hallazgos en este sentido son contradictorios. Un estudio señala que coágulos de fibrina formados a partir de Fg $\gamma A/\gamma'$ purificado, presentan predominio de fibras delgadas y la estructura de la malla es poco porosa en comparación con coágulos formados a partir de fibrinógeno $\gamma A/\gamma A$ y este hallazgo ha sido relacionado con un retardo en la remoción del fibrinopéptido B del Fg $\gamma A/\gamma'$ por parte de la trombina lo cual también retarda la agregación lateral de protofibrillas y por ende disminuye el grosor de las fibras de fibrina (52). Sin embargo, en dicho estudio no se tomó en cuenta la contaminación del Factor XIII co-purificado con el Fg $\gamma A/\gamma'$, lo cual podría influir en los resultados. Esto se indica en un trabajo posterior donde no se encuentra diferencia en la estructura de coágulos formados a partir de fibrinógeno $\gamma A/\gamma'$ y Fg total (no fraccionado en sus diferentes isoformas), preparado con altas concentraciones de Factor XIIIa (53). En contraste, estudios donde se usaron homodímeros γ'/γ' obtenido por recombinación genética en ausencia de factor XIII no mostraron diferencias estadísticamente significativas en los diámetros de fibras de fibrina con respecto a los controles (45). Por otro lado, la tasa de fibrinolisis del coágulo formado con $\gamma A/\gamma'$ es 10 veces más lenta que la isoforma $\gamma A/\gamma A$ solo si el coágulo es formado en presencia de Factor XIIIa (44). Al margen de los señalamientos anteriores la menor tasa de fibrinolisis de coágulos $\gamma A/\gamma'$ podría estar relacionado también con el hecho de que coágulos con predominio de fibras delgadas y estructura poco porosas son más resistentes a la lisis debido al retardo en la difusión las enzimas profibrinolíticas a través de ese tipo de estructura (54). Este tipo de patrón de malla de fibrina ha sido relacionado con mayor riesgo cardiovascular (55,56).

Fibrinógeno $\gamma A/\gamma'$ y su posible papel para modificar el riesgo cardiovascular: Existe controversia respecto a si Fg $\gamma A/\gamma'$ esta o no relacionado al riesgo cardiovascular. En base a las características y propiedades bioquímicas del Fg $\gamma A/\gamma'$ y la mayor resistencia a la fibrinólisis de coágulos formados con esta isoforma, se podría explicar algunos de los hallazgos de investigaciones clínicas que señalan asociación entre los niveles de Fg $\gamma A/\gamma'$ y las enfermedades trombóticas.

En 1.999 un estudio clínico encontró que la relación Fg $\gamma A/\gamma'$ /Fg total estaba aumentada en 335 pacientes con enfermedad arterial periférica, accidentes cerebrovasculares isquémicos e infartos al miocardio, en comparación con 433 casos controles (57). Posteriormente Lovely y colaboradores mostraron que los niveles de Fg $\gamma A/\gamma'$ fueron significativamente mayores en 91 pacientes con enfermedad arterial coronaria en comparación con 42 casos controles. Los autores señalaron además que la asociación entre la enfermedad arterial coronaria y los niveles de Fg $\gamma A/\gamma'$ era independiente de los niveles de Fg total (58). De manera similar Mannila y colaboradores en 2007 encontraron que los niveles de Fg $\gamma A/\gamma'$ eran significativamente mayores en pacientes con infarto al miocardio que los controles sanos, y aunque existe una correlación débil entre Fg $\gamma A/\gamma'$ y el nivel de Fg total en ambos grupos, dicha diferencia no se encontró en la relación Fg $\gamma A/\gamma'$ /Fg total entre los pacientes y controles (59). En contraste a los estudios anteriores, en el año 2005 se realizó una investigación que señala una asociación entre reducción en la relación Fg $\gamma A/\gamma'$ /Fg total e incremento en el riesgo de trombosis venosa en pacientes con trombofilia de Leiden (60). En este mismo orden de ideas los hallazgos de Mosesson y col en 2006 muestran que la reducción del contenido de Fg $\gamma A/\gamma'$ contribuye a la trombosis microvascular que caracteriza a los pacientes con Microangiopatía Trombótica, debido posiblemente a la reducción de la actividad Antitrombina I que confiere la cadena γ' (61).

De igual modo un estudio del año 2007 demostró que el péptido γ' 410-427 (presente en el extremo carboxiterminal de la cadena γ') era capaz de inhibir la activación del factor VIII de la coagulación por parte de la trombina y esto produce una inhibición selectiva de la vía intrínseca de la coagulación *in vitro*, este estudio señala además que el péptido γ' 410-427 redujo la formación de trombos inducidos por shunt arterio-venosos en un modelo in vivo en primates (62). Este mismo grupo de investigación pero en el año 2008 demostraron que el péptido γ' 410-427 al bloquear el exositio II de la trombina es capaz de inhibir la activación plaquetaria mediada por trombina (63).

Es así como un trabajo clínico del año 2008 encontró una relación Fg $\gamma A/\gamma'$ /Fg total mayor en 124 pacientes con ataques cardiacos durante la fase aguda con respecto a 125 controles sin embargo esta relación era menor durante la fase de convalecencia 3 meses después del episodio isquémico. En este estudio los autores sugieren que la disminución de los niveles de Fg $\gamma A/\gamma'$ en la fase convaleciente podría reflejar mejor los niveles en las etapas previas a el evento cardiovascular, lo cual podría sugerir que las propiedades antitromboticas del Fg $\gamma A/\gamma'$ son más importantes que sus propiedades protromboticas. (64)

Conclusión: Los hallazgos anteriores con respecto al Fg $\gamma A/\gamma'$, plantean elementos algo contradictorios respecto al papel que pueda jugar esta isoforma

en el riesgo cardiovascular. En apariencia la relación entre los niveles Fg $\gamma A/\gamma'$ y la trombosis podría depender del tipo de enfermedad vascular. Esta isoforma del Fg se ha visto asociada a riesgo protrombotico en enfermedades arteriales pero con efecto antitrombotico en enfermedades venosas. Tal vez en las enfermedades arteriales prevalecen los efectos protromboticos de la cadena γ' y esto puede ser atribuido a la estructura alterada de la malla de fibrina formada en presencia de altos niveles de esta isoforma del Fg y a la elevada actividad del factor XIII, mientras que los mecanismos antitromboticos de reducción en la generación de trombina y la activación plaquetaria puede jugar un rol protector en la relación entre la cadena γ' y la enfermedad trombotica venosa. Sin embargo este señalamiento es poco intuitivo tomando en consideración que las plaquetas desempeñan un papel más importante en trastornos tromboticos arteriales que en los venosos. Posiblemente existe una serie de mecanismos aún no identificados que pudieran contribuir al rol que juega el Fg $\gamma A/\gamma'$ en el desarrollo de eventos tromboticos. Es por ello que se deben ampliar los estudios para medir los niveles Fg $\gamma A/\gamma'$ tanto en enfermedades tromboticas arteriales como en las venosas. Estos estudios deben ser prospectivos para evaluar si los niveles de esta isoforma de Fg ya se encuentran alterados antes del evento trombotico o la posible alteración es consecuencia de la enfermedad cardiovascular. De igual modo se deben incluir otras variables (tales como consumo de cigarrillos, alcohol, ejercicio, obesidad entre otros) que influyen en los niveles totales de Fg y que pudieran influir además en los niveles de Fg $\gamma A/\gamma'$.

BIBLIOGRAFÍA

1. Mosesson MW, Siebenlist KR, Meh DA. The structure and biological features of fibrinogen and fibrin. *Ann NY Acad Sci.* 2001;936:11-30.
2. Goodman A, Godman LS, Rall TW, Murad F. Las bases farmacológicas de terapéutica. 7.ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 1988:1291-90.
3. Meade TW, Mellows S, Brozovic S, Haemostatic function and ischaemic heart disease: principal results of the Northwick Park Heart Study. *Lancet.* 1986; 2(8506): 533-7.
4. Wilhelmsen L, Svardsudd K, Korsan-Bengtson K, Larsson B, Welin L, Tibblin G. Fibrinogen as a risk factor for stroke and myocardial infarction. *N Engl J Med.* 1984; 311(8):501-5.
5. Schneider DJ, Taatjes DJ, Howard DB, Sobel BE. Increased reactivity of platelets induced by fibrinogen independent of its binding to the IIb-IIIa surface glycoprotein: a potential contributor to cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol.* 1999;33(1):261-6
6. Koenig W, Ernst E. The possible role of hemorheology in atherothrombogenesis. *Atherosclerosis.* 1992;94(2-3):93-107.
7. Scutcheon MC, Ross-Murphy SB, Bennett GM, Stirling Y, Meade TW. Changes in clot deformability- a possible explanation for the epidemiological association between plasma fibrinogen concentration and myocardial infarction. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1994;5(5):719-23.
8. Henschen A, Lottspeich F, Kehl M, Southan C. Covalent structure of fibrinogen. *Ann N Y Acad Sci.* 1983;408:28-43.
9. Privalov PL, Medved LV. Domains in the fibrinogen molecule. *J Mol Biol.* 1982;159(4):665-83.
10. Veklich YI, Gorkun OV, Medved LV, Nieuwenhuizen W, Weisel JW. Carboxyl-terminal portions of the alpha chains of fibrinogen and fibrin. Localization by electron microscopy and the effects of isolated alpha C fragments on polymerization. *J Biol Chem.* 1993;268(18):13577-85.

11. Wolfenstein-Todel C, Mosesson MW. Carboxy-terminal amino acid sequence of a human fibrinogen gamma-chain variant (gamma'). *Biochemistry*. 1981;20(21):6146-9.
12. Wolfenstein-Todel C, Mosesson MW. Human plasma fibrinogen heterogeneity: evidence for an extended carboxyl-terminal sequence in a normal gamma chain variant (gamma'). *Proc Natl Acad Sci*. 1980;77(9):5069-73.
13. Blombäck B, Hessel B, Hogg D, Therkildsen L. A two-step fibrinogen--fibrin transition in blood coagulation. *Nature*. 1978;275(5680):501-5.
14. Laudano AP, Doolittle RF. Synthetic peptide derivatives that bind to fibrinogen and prevent the polymerization of fibrin monomers. *Proc Natl Acad Sci*. 1978;75(7):3085-9.
15. Pandya BV, Gabriel JL, O'Brien J, Budzynski AZ. Polymerization site in the beta chain of fibrin: mapping of the B beta 1-55 sequence. *Biochemistry*. 1991;30(1):162-8.
16. Shimizu A, Nagel GM, Doolittle RF. Photoaffinity labeling of the primary fibrin polymerization site: isolation and characterization of a labeled cyanogen bromide fragment corresponding to gamma-chain residues 337-379. *Proc Natl Acad Sci*. 1992;89(7):2888-92.
17. Ferry JD. The Mechanism of Polymerization of Fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci*. 1952;38(7):566-9.
18. Hantgan R, McDonagh J, Hermans J. Fibrin assembly. *Ann N Y Acad Sci*. 1983;408:344-66.
19. Matacić S, Loewy AG. The identification of isopeptide crosslinks in insoluble fibrin. *Biochem Biophys Res Commun*. 1968;30(4):356-62.
20. Chen R, Doolittle RF. Identification of the polypeptide chains involved in the cross-linking of fibrin. *Proc Natl Acad Sci*. 1969;63(2):420-7.
21. Chen R, Doolittle RF. cross-linking sites in human and bovine fibrin. *Biochemistry*. 1971;10(24):4487-91.
22. McKee PA, Mattock P, Hill RL. Subunit structure of human fibrinogen, soluble fibrin, and cross-linked insoluble fibrin. *Proc Natl Acad Sci*. 1970;66(3):738-44.
23. Mosesson MW, Siebenlist KR, Amrani DL, DiOrio JP. Identification of covalently linked trimeric and tetrameric D domains in crosslinked fibrin. *Proc Natl Acad Sci*. 1989;86(4):1113-7.
24. Shainoff JR, Urbanic DA, DiBello PM. Immunoelectrophoretic characterizations of the cross-linking of fibrinogen and fibrin by factor XIIIa and tissue transglutaminase. Identification of a rapid mode of hybrid alpha-/gamma-chain cross-linking that is promoted by the gamma-chain cross-linking. *J Biol Chem*. 1991;266(10):6429-37.
25. Hoylaerts M, Rijken DC, Lijnen HR, Collen D. Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin. *J Biol Chem*. 1982;257(6):2912-9.
26. Lijnen HR, Zamarron C, Blaber M, Winkler ME, Collen D. Activation of plasminogen by pro-urokinase. I. Mechanism. *J Biol Chem*. 1986;261(3):1253-8.
27. Gurewich V, Pannell R, Louie S, Kelley P, Suddith RL, Greenlee R. Effective and fibrin-specific clot lysis by a zymogen precursor form of urokinase (pro-urokinase). A study in vitro and in two animal species. *J Clin Invest*. 1984;73(6):1731-9.
28. Hanss M, Collen D. Secretion of tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor by cultured human endothelial cells: modulation by thrombin, endotoxin, and histamine. *J Lab Clin Med*. 1987;109(1):97-104.
29. van Mourik JA, Lawrence DA, Loskutoff DJ. Purification of an inhibitor of plasminogen activator (antiactivator) synthesized by endothelial cells. *J Biol Chem*. 1984 10;259(23):14914-21.
30. Mosesson MW, Finlayson JS, Umfleet RA. Human fibrinogen heterogeneities. 3. Identification of chain variants. *J Biol Chem*. 1972;247(16):5223-7.

31. Fornace AJ Jr, Cummings DE, Comeau CM, Kant JA, Crabtree GR. Structure of the human gamma-fibrinogen gene. Alternate mRNA splicing near the 3' end of the gene produces gamma A and gamma B forms of gamma-fibrinogen. *J Biol Chem*. 1984;259(20):12826-30.
32. Chung DW, Davie EW. gamma and gamma' chains of human fibrinogen are produced by alternative mRNA processing. *Biochemistry*. 1984;23(18):4232-6.
33. Wolfenstein-Todel C, Mosesson MW. Carboxy-terminal amino acid sequence of a human fibrinogen gamma-chain variant (gamma'). *Biochemistry*. 1981;20(21):6146-9.
34. Farrell DH, Mulvihill ER, Huang SM, Chung DW, Davie EW. Recombinant human fibrinogen and sulfation of the gamma' chain. *Biochemistry*. 1991;30(39):9414-20.
35. Wolfenstein-Todel C, Mosesson MW. Human plasma fibrinogen heterogeneity: evidence for an extended carboxyl-terminal sequence in a normal gamma chain variant (gamma'). *Proc Natl Acad Sci*. 1980;77(9):5069-73.
36. Siebenlist KR, Meh DA, Mosesson MW. Plasma factor XIII binds specifically to fibrinogen molecules containing gamma chains. *Biochemistry*. 1996;35(32):10448-53.
37. Meh DA, Siebenlist KR, Brennan SO, Holyst T, Mosesson MW. The amino acid sequence in fibrin responsible for high affinity thrombin binding. *Thromb Haemost*. 2001;85(3):470-4.
38. Farrell DH, Thiagarajan P, Chung DW, Davie EW. Role of fibrinogen alpha and gamma chain sites in platelet aggregation. *Proc Natl Acad Sci*. 1992;89(22):10729-32.
39. Cahill M, Mistry R, Barnett DB. The human platelet fibrinogen receptor: clinical and therapeutic significance. *Br J Clin Pharmacol*. 1992;33(1):3-9.
40. Kirschbaum NE, Mosesson MW, Amrani DL. Characterization of the γ chain platelet binding site on fibrinogen fragment D. *Blood* 1992; 79(10): 2643-8.
41. Siebenlist KR, Meh DA, Mosesson MW. Plasma factor XIII binds specifically to fibrinogen molecules containing gamma chains. *Biochemistry*. 1996;35(32):10448-53.
42. Moaddel M, Farrell DH, Daugherty MA, Fried MG. Interactions of human fibrinogens with factor XIII: roles of calcium and the gamma' peptide. *Biochemistry*. 2000;39(22):6698-705.
43. Moaddel M, Falls LA, Farrell DH. The role of gamma A/gamma ' fibrinogen in plasma factor XIII activation. *J Biol Chem*. 2000;275(41):32135-40.
44. Falls LA, Farrell DH. Resistance of gammaA/gamma' fibrin clots to fibrinolysis. *J Biol Chem*. 1997;272(22):14251-6.
45. Collet JP, Nagaswami C, Farrell DH, Montalescot G, Weisel JW. Influence of gamma' fibrinogen splice variant on fibrin physical properties and fibrinolysis rate. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(2):382-6.
46. Kaczmarek E, McDonagh J. Thrombin binding to the A alpha-, B beta-, and gamma-chains of fibrinogen and to their remnants contained in fragment E. *J Biol Chem*. 1988;263(27):13896-900.
47. Meh DA, Siebenlist KR, Mosesson MW. Identification and characterization of the thrombin binding sites on fibrin. *J Biol Chem*. 1996;271(38):23121-5.
48. Lovely RS, Moaddel M, Farrell DH. Fibrinogen gamma' chain binds thrombin exosite II. *J Thromb Haemost*. 2003;1(1):124-31.
49. Pospisil CH, Stafford AR, Fredenburgh JC, Weitz JI. Evidence that both exosites on thrombin participate in its high affinity interaction with fibrin. *J Biol Chem*. 2003;278(24):21584-91.
50. Mosesson MW. Antithrombin I. Inhibition of thrombin generation in plasma by fibrin formation. *Thromb Haemost*. 2003;89(1):9-12.
51. Siebenlist KR, Mosesson MW, Hernandez I, Bush LA, Di Cera E, Shainoff JR, Di Orio JP, Stojanovic L. Studies on the basis for the properties of fibrin produced from fibrinogen-containing gamma' chains. *Blood*. 2005; 106(8):2730-6.

52. Cooper AV, Standeven KF, Ariëns RA. Fibrinogen gamma-chain splice variant gamma' alters fibrin formation and structure. *Blood*. 2003;102(2):535-40.
53. Lim BCB, Ariens RAS, Connell SD, Smith DAM, Weisel JW, Grant PJ. Cross-linking of fibrin by factor XIII and its effect on fibrin structure/function. *J Thromb Haemost*. 2003; 1 Supplement 1 Abstract number OC370.
54. Collet JP, Park D, Lesty C, Soria J, Soria C, Montalescot G, Weisel JW. Influence of fibrin network conformation and fibrin fiber diameter on fibrinolysis speed: dynamic and structural approaches by confocal microscopy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(5):1354-61.
55. Fatah K, Silveira A, Tornvall P, Karpe F, Blombäck M, Hamsten A. Proneness to formation of tight and rigid fibrin gel structures in men with myocardial infarction at a young age. *Thromb Haemost*. 1996;76(4):535-40.
56. Fatah K, Hamsten A, Blombäck B, Blombäck M. Fibrin gel network characteristics and coronary heart disease: relations to plasma fibrinogen concentration, acute phase protein, serum lipoproteins and coronary atherosclerosis. *Thromb Haemost*. 1992;68(2):130-5.
57. Drouet L, Paolucci F, Pasqualini N, Laprade M, Ripoll L, Mazoyer E, Bal dit Sollier C, Vanhove N. Plasma gamma'/gamma fibrinogen ratio, a marker of arterial thrombotic activity: a new potential cardiovascular risk factor?. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1999;10 Suppl 1:S35-9.
58. Lovely RS, Falls LA, Al-Mondhry HA, Chambers CE, Sexton GJ, Ni H, Farrell DH. Association of gammaA/gamma' fibrinogen levels and coronary artery disease. *Thromb Haemost*. 2002;88(1):26-31.
59. Mannila MN, Lovely RS, Kazmierczak SC, et al. Elevated plasma fibrinogen γ' concentration is associated with myocardial infarction: effects of variation in fibrinogen genes and environmental factors. *J Thromb Haemost*. 2007;5(4):766-773.
60. Uitte de Willige S, de Visser M, Houwing-Duistermaat J, Rosendaal F, Vos H, Bertina R. Genetic variation in the fibrinogen gamma gene increases the risk of deep venous thrombosis by reducing plasma fibrinogen γ' levels. *Blood*. 2005; 106(13): 4176-83.
61. Mosesson MW, Hernandez I, Raife T, Medved L, Yakpvlev S, Simpson-Haidaris P, Uitte de Willige S, Bertina R. Plasma fibrinogen gamma prime chain content in the thrombotic microangiopathy syndrome. *J Thromb Haemost*. 2007; 5(1):62-9.
62. Lovely R, Boshkov L, Marzec U ; Hanson S, Farrell D. Fibrinogen [gamma]' chain carboxy terminal peptide selectively inhibits the intrinsic coagulation pathway. *B J of Haematology*. 2007; 139(3):494-503.
63. Lovely R, Rein Ch, White T, Jouihan S, Boshkov L, Bakke O, McCarty O, Farrell D. $\gamma A/\gamma'$ fibrinogen inhibits thrombin-induced platelet aggregation. *Thromb Haemost*. 2008 ;100: 837-46
64. Cheung E, Uitte de Willige S, Vos H, Leebeek F, Dippel D, Bertina R, de Maat M. Fibrinogen γ' in Ischemic Stroke A Case-Control Study. *Stroke*. 2008; 39: 1033-1035.