

# Primed to act

## Citation for published version (APA):

Omarova, F. (2016). *Primed to act: the effect of fibrinogen 'Y' on thrombin functions*. Maastricht University.

## Document status and date:

Published: 01/01/2016

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

## Summary

The function of the hemostatic system is to stop blood loss after vascular damage. The hemostatic response includes the formation of a platelet plug at the site of vascular injury and its subsequent stabilization with a fibrin network which is formed by the coagulation cascade. The enzyme thrombin regulates clot formation and degradation by converting fibrinogen into fibrin and by activating platelets, several coagulation factors (FV, FVIII, FXI and FXIII), an anticoagulant protein (protein C) and a fibrinolysis inhibitor (TAFI). The latter two functions require thrombin to be bound to its endothelial receptor thrombomodulin (TM). Overactive coagulation (hypercoagulability) causes excessive blood clotting, which may lead to thrombotic disorders.

Fibrinogen is a large liver-derived glycoprotein which circulates in plasma at a concentration of approximately 9  $\mu\text{M}$ . Every fibrinogen molecule comprises two sets of three chains ( $\text{A}\alpha$ ,  $\text{B}\beta$  and  $\gamma$ ) each encoded by a different gene. Approximately 8-15% of all fibrinogen molecules contain an alternatively spliced variant of the  $\gamma$  chain, known as  $\gamma'$  chain, which binds to thrombin with high affinity and modulates its activity. Low levels of fibrinogen  $\gamma'$  (*i.e.* fibrinogen containing the  $\gamma'$  chain), such as predicted by the *FGG H2* haplotype, have been associated with increased risk of venous thrombosis. The work described in this thesis was aimed at better understanding of this association by elucidating how the interaction of thrombin with fibrinogen  $\gamma'$  modifies its activity on its numerous substrates. Since it was previously demonstrated that fibrinogen  $\gamma'$  inhibits thrombin-mediated platelet aggregation and FVIII activation, we focused on the remaining substrates of thrombin, namely FV, FXI, FXIII, protein C and TAFI. The effect of fibrinogen  $\gamma'$  on thrombin-mediated activation of these substrates was studied in model systems using a short peptide with an amino acid sequence identical to that of the thrombin-binding site on fibrinogen  $\gamma'$ . The overall effect of fibrinogen  $\gamma'$  on coagulation in plasma was evaluated using the thrombin generation assay.

**Chapter 1** introduces the hemostatic system and provides a detailed overview of the coagulation process. Thrombin structure, functions and substrates are reviewed. Furthermore, the structure and functions of fibrinogen and particularly fibrinogen  $\gamma'$  are described. In addition, this chapter provides a detailed overview of our current knowledge of the specific effects of this form of fibrinogen on components of the

---

hemostatic system and its relationship with clinical conditions. Lastly, the calibrated automated thrombography (CAT) assay that measures thrombin generation is described.

The work presented in **Chapter 2** demonstrates that fibrinogen prolongs the lag time of thrombin generation at low procoagulant stimuli. This study also shows that the synthetic fibrinogen  $\gamma'$  peptide effectively inhibits thrombin generation. Furthermore, we show that the fibrinogen  $\gamma'$  peptide inhibits FV activation by thrombin, both in a model system and in plasma, which suggests a novel mechanism underlying the anticoagulant effect of fibrinogen  $\gamma'$ . This may contribute to the increased risk of venous thrombosis associated with reduced fibrinogen  $\gamma'$  levels such as predicted by the *FGG H2* haplotype.

In **Chapter 3** we elaborate on the observation that in carriers of the FV Leiden mutation (the most common hereditary cause of APC resistance) carriership of the *FGG H2* haplotype is associated with a reduced sensitivity to activated protein C (APC), suggesting a relationship between fibrinogen  $\gamma'$  and plasma APC resistance. Using a plasma model system, we confirm that fibrinogen and particularly its  $\gamma A/\gamma'$  isoform increases the APC sensitivity in normal and FV Leiden plasma. Moreover, we show that this effect can be reproduced by the fibrinogen  $\gamma'$  peptide and is likely explained by the ability of the peptide to inhibit thrombin-mediated FV and FVIII activation, resulting in reduced FVa and FVIIIa formation, which makes it easier for APC to inhibit thrombin generation *via* inactivation of FVa and FVIIIa. Although the fibrinogen  $\gamma'$  peptide also inhibits protein C activation by the thrombin/TM complex, causing less APC to be generated, its net effect in plasma is still anticoagulant, as shown by the effect of the peptide on the response of plasma to the addition of TM, which leads to the activation of endogenous protein C.

While setting the conditions to investigate the effect of the fibrinogen  $\gamma'$  peptide on FXI activation by thrombin, we came across the complexity of this reaction *in vitro*. **Chapter 4** describes the stimulatory effect of  $\text{Na}^+$  binding to thrombin and the inhibitory effect of increased ionic strength on thrombin-catalyzed FXI activation. Additionally, we provide evidence that negatively charged phospholipid surfaces may act as a (physiological) cofactor for thrombin-mediated FXI activation by showing that thrombin and FXI both bind to negatively charged phospholipids and that negatively charged phospholipid vesicles considerably stimulate FXI activation by thrombin. Moreover, we demonstrate that the fibrinogen  $\gamma'$  peptide inhibits thrombin-mediated

FXI activation, proposing a novel mechanism that can contribute to the overall anticoagulant effect of the peptide.

In **Chapter 5** we report that the fibrinogen  $\gamma'$  peptide inhibits the activation of TAFI by the thrombin/TM complex. In contrast, thrombin-mediated FXIII activation was not affected by the peptide neither in the absence nor in the presence of purified fibrinogen, a cofactor of the reaction. Combined with previously published results, these findings complete the overview of the effects of the fibrinogen  $\gamma'$  peptide on all functions of thrombin.

Finally, in **Chapter 6** we discuss the main findings presented in this thesis and summarize the general conclusions. This chapter also provides an analysis of the results in relation to published research, and shows how our studies contribute to the understanding of the overall properties of fibrinogen  $\gamma'$  and particularly of its binding to thrombin. Since thrombin plays an essential role in the hemostatic process, it is important to have a complete understanding of the effects of fibrinogen  $\gamma'$  on the major functions of thrombin. Our studies help to explain why low levels of fibrinogen  $\gamma'$  are associated with thrombotic disorders in humans and provide a basis for the design of novel antithrombotic treatments. Finally, we describe possible implications of the findings and provide future research perspectives.



## Samenvatting

A



A

## Samenvatting

De primaire functie van het hemostase systeem is het stoppen van bloedverlies dat optreedt na beschadiging van de wand van een bloedvat (wond). De hemostase respons omvat de vorming van een bloedplaatjesprop ter hoogte van de vasculaire schade, die vervolgens verstevigd wordt door een fibrinenetwerk, gevormd door de stollingscascade. Het enzyme trombine reguleert de vorming en afbraak van deze prop (klonter) door het omzetten van fibrinogeen in fibrine en door het activeren van bloedplaatjes, verschillende stollingsfactoren (FV, FVIII, FXI en FXIII), het antistollingseiwit proteïne C en de fibrinolyse remmer TAFI. Voor de activering van de laatste twee genoemde factoren is het noodzakelijk dat trombine gebonden is aan de endotheel receptor trombomoduline (TM). Overmatige bloedstolling kan leiden tot ongewenste bloedstolsels, die op hun beurt kunnen resulteren in trombotische aandoeningen.

Fibrinogeen is een glycoproteïne met een hoog molecuulgewicht wat gesynthetiseerd wordt in de lever. Het circuleert in het plasma in een concentratie van ongeveer 9  $\mu\text{M}$ . Het fibrinogeen molecuul is een dimeer bestaande uit twee sets van drie ketens ( $\text{A}\alpha$ ,  $\text{B}\beta$  en  $\gamma$ ), die elk gecodeerd worden door een afzonderlijk gen. Ongeveer 8-15% van de fibrinogeen moleculen aanwezig in het bloed bevatten een alternatieve splicevariant van de  $\gamma$  keten, ook wel de  $\gamma'$  keten genoemd. De  $\gamma'$  keten bindt aan trombine met een hoge affiniteit en moduleert na binding de enzymatische activiteit van trombine. Het *FGG H2* haplotype is geassocieerd met verminderde hoeveelheden fibrinogeen met een  $\gamma'$  keten hetgeen kan leiden tot een verhoogd risico op veneuze trombose. Het onderzoek beschreven in dit proefschrift was met name gericht op het verwerven van meer inzicht in de associatie tussen fibrinogeen  $\gamma'$  en het risico op veneuze trombose. Hierbij werd onder andere specifiek aandacht besteed aan de vraag hoe de interactie tussen fibrinogeen  $\gamma'$  en trombine de trombine activiteit ten opzichte van haar substraten beïnvloedt. Eerder werd al aangetoond dat fibrinogeen  $\gamma'$  de trombine-gemedieerde bloedplaatjesaggregatie en FVIII activering door trombine remt. Dit proefschrift beschrijft onderzoek naar het effect van fibrinogeen  $\gamma'$  op de andere substraten van trombine, waaronder FV, FXI, FXIII, proteïne C en TAFI. Het effect van fibrinogeen  $\gamma'$  op trombine-gemedieerde activering van deze substraten werd bestudeerd in model systemen waarbij gebruik gemaakt werd van een kort peptide



---

met een aminozuurvolgorde die gelijk is aan die van de trombine bindingsplaats op fibrinogeen  $\gamma'$ . Het algehele effect van fibrinogeen  $\gamma'$  in het bloedplasma werd geëvalueerd door gebruik te maken van de trombinegeneratie test.

In **hoofdstuk 1** wordt het hemostase systeem geïntroduceerd en wordt een gedetailleerd overzicht gegeven van het bloedstollingsproces. Voorts worden de structuur en de functies van trombine en haar substraten verder in detail toegelicht. Ook wordt er aandacht besteed aan de structuur en functies van fibrinogeen, in het bijzonder van fibrinogeen  $\gamma'$ . Daarnaast beschrijft dit hoofdstuk onze huidige kennis met betrekking tot de specifieke effecten van deze fibrinogeen variant op de componenten van het hemostase systeem en de klinische condities waarmee fibrinogeen  $\gamma'$  in verband wordt gebracht. Tenslotte wordt de meting van de trombine vorming met behulp van de *calibrated automated thrombography (CAT) assay* beschreven.

Het onderzoek beschreven in **hoofdstuk 2** toont aan dat wanneer de stolling geïnitieerd wordt met lage concentraties weefselfactor, fibrinogeen de *lag time* van trombinevorming aanzienlijk verlengt. Deze studie laat tevens zien dat het synthetisch fibrinogeen  $\gamma'$  peptide in staat is op effectieve wijze de trombinevorming te remmen. Voorts wordt er in dit hoofdstuk aangetoond dat, zowel in een model systeem als in het plasma, het fibrinogeen  $\gamma'$  peptide FV activering door trombine kan remmen, wat een nieuw mechanisme is dat kan bijdragen aan het anticoagulante effect van fibrinogeen  $\gamma'$ . Dit mechanisme kan ook een rol spelen in het verhoogde risico op veneuze trombose, wat geassocieerd is met verlaagde fibrinogeen  $\gamma'$  hoeveelheden, zoals voorspeld door het *FGG H2* haplotype.

In **hoofdstuk 3** laten we zien dat in dragers van de FV Leiden mutatie (de meest voorkomende erfelijke oorzaak van APC resistentie) het dragerschap van het *FGG H2* haplotype geassocieerd is met een verminderde gevoeligheid van de trombinevorming voor geactiveerd proteïne C (APC), een cruciaal anticoagulant eiwit. Deze bevinding suggereert dat er mogelijk een relatie is tussen de effecten van fibrinogeen  $\gamma'$  en plasma APC resistentie. Dit werd bevestigd door de bevinding dat fibrinogeen, en met name de  $\gamma A/\gamma'$  isovorm, de APC gevoeligheid van normaal en FV Leiden bloed plasma doet toenemen. Bovendien kon dit effect worden gereproduceerd door toevoeging van het fibrinogeen  $\gamma'$  peptide aan plasma. Deze bevinding wordt waarschijnlijk verklaard door het feit dat het  $\gamma'$  peptide de activering

van FV en FVIII door trombine remt, waardoor er minder FVa en FVIIIa gevormd wordt en het voor APC gemakkelijker wordt om de trombine vorming te remmen. Hoewel het fibrinogeen  $\gamma'$  peptide ook in staat is de proteïne C activering door het trombine/TM complex te remmen, wat resulteert in de vorming van lagere hoeveelheden APC, blijkt het peptide in het plasma nog steeds een netto anticoagulant effect te hebben. Dit wordt geïllustreerd door het effect van het peptide op de trombinevorming in plasma waarin APC endogeen gevormd wordt door toevoeging van trombomoduline.

Bij het bepalen van de experimentele condities noodzakelijk voor de bestudering van het effect van fibrinogeen  $\gamma'$  op de trombine-gemedieerde FXI activering, werd duidelijk hoe complex deze *in vitro* reactie was. **Hoofdstuk 4** beschrijft het stimulerende effect van  $\text{Na}^+$  binding op de activiteit trombine, alsmede het remmende effect van een verhoogde ionsterkte op de activering van FXI door trombine. Voorts tonen wij in dit hoofdstuk aan dat negatief geladen fosfolipide oppervlakken een mogelijke fysiologische cofactor zijn in de door trombine gemedieerde FXI activering. In dit hoofdstuk laten we zien dat trombine en FXI beide kunnen binden aan negatief geladen fosfolipiden en dat negatief geladen fosfolipide oppervlakken de activering van FXI door trombine stimuleren. Verder tonen we aan dat het fibrinogeen  $\gamma'$  peptide de door trombine gekatalyseerde FXI activering remt, hetgeen een nieuw mechanisme suggereert wat kan bijdragen aan de algemene antistollende werking van het peptide.

In **hoofdstuk 5** rapporteren we dat het fibrinogeen  $\gamma'$  peptide de activering van TAFI door het trombine/TM complex kan verhinderen. Trombine-gemedieerde FXIII activering, daarentegen, werd niet beïnvloed door het fibrinogeen  $\gamma'$  peptide, noch in aanwezigheid noch in afwezigheid van gezuiverd fibrinogeen, een cofactor van deze reactie. Gecombineerd met reeds gepubliceerde resultaten, geven deze bevindingen een volledig overzicht van de effecten van het fibrinogeen  $\gamma'$  peptide op de meest belangrijke functies van trombine.

In **hoofdstuk 6** worden de conclusies van de studies beschreven in dit proefschrift samengevat en worden de belangrijkste bevindingen bediscussieerd. Het geeft een gedetailleerde analyse van alle resultaten in relatie tot de bestaande wetenschappelijke literatuur. Verder laten we in dit hoofdstuk zien hoe onze studies een bijdrage leveren aan het algemeen begrip van de eigenschappen van fibrinogeen  $\gamma'$ , met name met betrekking tot de binding aan trombine. Aangezien trombine een

---

cruciale rol speelt in de hemostase respons is het belangrijk om een volledig begrip te hebben van de effecten van fibrinogeen  $\gamma'$  op alle functies van trombine. De inzichten verkregen uit de studies gepresenteerd in dit proefschrift verklaren waarom lage concentraties fibrinogeen  $\gamma'$  geassocieerd zijn met trombotische aandoeningen in de mens, en leggen de basis voor de ontwikkeling van nieuwe antitrombotische therapieën. Tenslotte beschrijven we de mogelijke implicaties van onze bevindingen, en bediscussiëren we mogelijk relevante toekomstige onderzoeksperspectieven.