

• 知识介绍 •

凝血级联反应中的大分子机制

郭晓杰, 朱丹*, 沈健*

(南京师范大学化学与材料科学学院, 生物医药功能材料国家地方联合工程研究中心, 南京 210023)

摘要: 凝血是常见的生理和病理现象。凝血的发生是一系列级联的化学反应, 首先是凝血因子在内在或外来因素的触发下产生凝血酶原的激活物, 使得凝血酶原转化为凝血酶, 纤维蛋白原在凝血酶的作用下, 脱去多肽链段转化为纤维蛋白单体, 与相邻单体聚合形成纤维蛋白聚合物, 最终与血液环境中的血小板、红细胞和内皮细胞等形成网络结构血凝块。本文从大分子化学和物理角度, 分析了凝血过程中凝血酶、纤维蛋白的大分子反应和结构变化。

关键词: 凝血; 生物大分子; 凝血酶; 纤维蛋白; 高分子化学

The Macromolecular Mechanism in the Coagulation Cascade

GUO Xiao-jie, ZHU Dan*, SHEN Jian*

(National and Local Joint Engineering Research Center of Biomedical Functional Materials, School of Chemistry and Materials Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

Abstract: Coagulation is a commonly physiological and pathological phenomenon. The occurrence of coagulation is a cascade of chemical reactions. Firstly, the coagulation factors generate the activator of prothrombin under the trigger of internal or external stimuli, so that the prothrombin is converted into thrombin. Secondly, the polypeptide chain is removed from fibrinogen with the activation of thrombin and fibrinogen is converted into the monomers of fibrin, which are polymerized to form the polymer of fibrin. Thirdly, fibrin combines with platelets, red blood cells, and endothelial cells in the blood and finally they form a network of blood clot. In this study, the molecular reactions and the structural changes of thrombin and fibrin in the coagulation have been analyzed from the perspective of macromolecular chemistry and physics.

Keywords: Coagulation; Biomacromolecules; Thrombin; Fibrin; Polymer chemistry

大分子物质如核酸、蛋白质等对于人体内的生化过程是必不可少的, 大分子的生物功能与三维结构密切相关。我们需要了解大分子在人体内生物过程和行为表现来解释生命的基本原理, 用化学反应机理、化学模型、成键类型、空间结构趋向、能量定律、动力学和热力学等化学知识解释人体内生物过程, 使基础生物学、生物医学、生物技术的研究获得进一步发展。目前已确定的各类蛋

白质的 3D 结构、氨基酸序列、蛋白质家族、功能位点和结合位点等信息均收录进蛋白质数据库^[1~3]。迄今为止, 我们对于生物大分子的认识仍然局限在静态的蛋白质结构或自组装, 对于大分子关联的具体生理或病理现象, 却很少深究到大分子结构或结构变化的分子层面上来讨论。本篇知识介绍中, 将从大分子的物理和化学角度, 来分析人体的生理或病理的凝血过程。

收稿: 2022-08-02; 修回: 2022-08-29

作者简介: 郭晓杰(1997-), 女, 硕士研究生, 高分子物理与化学专业

* 通讯联系人: 朱丹, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事高分子结构与表征研究。E-mail: zhudan@nynu.edu.cn; 沈健, 博士, 教授, 博士生导师, 生物医用功能材料和表界面化学领域的专家。E-mail: shenjian@nju.edu.cn

doi:10.14028/j.cnki.1003-3726.2023.04.010

凝血,是指血液状态由流动的液体转化为不流动的凝胶态的过程,既是生理性止血的重要部分,也是重症患者高发的病症之一。据临床统计,ICU重症病人并发凝血功能障碍的几率高达 10%~40%。凝血功能障碍涉及凝血与出血的动态平衡失调,患者有出血或血栓形成的风险^[4]。新冠肺炎(COVID-19)的危重患者,普遍出现血栓、弥散性凝血,或者出血等凝血功能障碍^[5~8]。

1 凝血级联反应

参与凝血过程的物质统称为凝血因子。凝血因子是参与血液凝固过程的各种组分,目前共有 12 种,除了因子 IV 是 Ca^{2+} 以外,其余均为蛋白质。除因子 III 以外,其他均存在于新鲜血浆之中。由国际凝血因子命名委员会(International Committee on the Nomenclature of Blood Clotting Factors)按发现的先后顺序(William's Hematology 9th Edition),以罗马数字 I~XIII 统一命名,活化后的凝血因子,在罗马数字的右下方以字母“a” (active)标示,是由其无活性的前体酶原经活化裂解特定定位点的肽键转化而来,以酶原的形式存在,可避免正常机体的血液在流动时发生凝固,具有重要的生理意义。

传统的凝血级联反应认为凝血过程分为内源

性和外源性凝血两个途径。内源性和外源性凝血的区别就在于参与凝血过程的物质是否全部来自血浆内还是有外来的因子。譬如在就医抽血时,若针管不慎将毛细血管戳破,几小时后便可在针孔处及其周围观察到青紫色,这便是由于刺破的血管壁组织细胞释放出组织因子,而启动外源性凝血的缘故。而若将抽出的新鲜血液转移至玻璃器皿中,很快便可看到血液开始凝固,这是因为显负电性的玻璃器皿与血液接触后,诱发了内源性凝血^[9]。

如图 1 所示,在内源性凝血途径中,异物或者破损内皮的胶原表面可以吸附因子 XII 和高分子量激肽原 (high molecular weight kininogen, HMW-K), HMW-K 是一种分子量为 1.1×10^5 的蛋白,通常与前激肽释放酶 (Prekallikarein, pre-K) 以 1 : 1 的复合形式存在于血浆之中,是活化 XII 因子的辅助因子^[10]。同时,血小板也被激活,释放磷脂和血小板因子 (platelet factor, PL)。接下来,因子 XI 被 XIIa 激活,形成 XIa, XIa 又使得 IX 激活, IXa 在血小板磷脂、血小板因子、钙离子的作用下,与 VIIIa 形成 IXa-VIIIa 复合物,该复合物可以活化因子 X。参加该过程的凝血因子均来自于血浆内,所以称为“内源性”,临床上常以活化部分凝血活酶时间 (Activated Partial Thromboplastin Time, APTT) 来反映体内内源性凝血途径的状况。

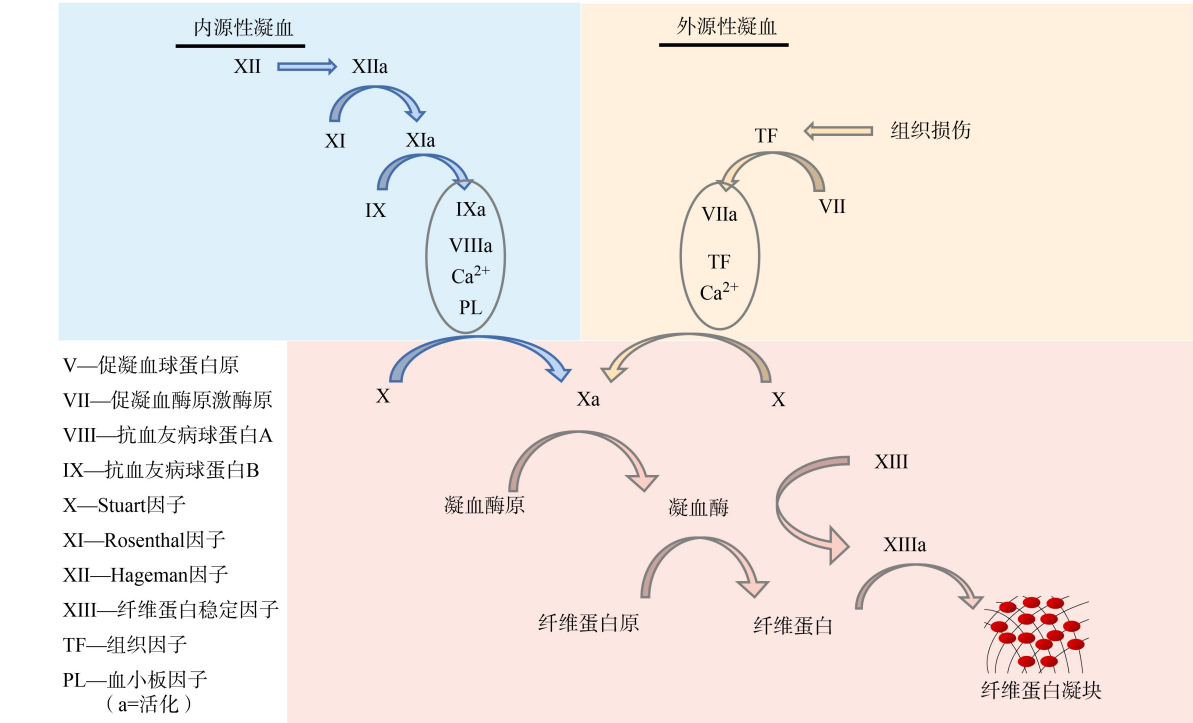


图 1 凝血级联反应示意图

Figure 1 The schematics of cascade coagulation pathways

所谓因子的活化往往是因子在蛋白酶的作用下,发生了肽键的断裂,原先的分子链断裂或者构象发生改变。例如 XII 在 pre-K 作用下 Arg353-Val354 断裂^[9,11],转化为 XIIa,通过二硫键连接在一起的双链蛋白酶,其中 C 端的轻链($M_r=2.8 \times 10^4$)包含了具有催化活性的三个残基(His-40, Asp-89, Ser-191),而 N 端的重链($M_r=5.2 \times 10^4$)中含有带有负电荷的表面结合区。

在创伤、外科手术、恶性肿瘤以及产科意外等情况发生时,广泛存在于内皮下的各种细胞质膜中的特异性跨膜糖蛋白组织因子(Tissue Factor, TF)被释放到血液中^[5,12~15],启动外源性凝血,如图 1 中外源性凝血过程所示。在钙离子的参与下,因子 VII 通过 γ -羧化谷氨酸与 TF 的磷脂部分结合形成 1:1 复合物,活化形成 VIIa,与磷脂和 Ca^{2+} 共同作用下形成 X 激活复合物,比 VIIa 单独存在时激活 X 会增强 1.6×10^4 倍^[16,17]。临床医学凝血功能测试中以凝血酶原时间(Prothrombin Time, PT)来反映外源性凝血途径的状况。由于在该过程参与的凝血因子并非全部存在于血浆中,还有外来的凝血因子如组织因子参与凝血,所以称为“外源性”凝血,是从 TF 释放到血浆而启动,直至激活 X 的过程。

随着人们对凝血过程认识的深入,对传统的凝血级联反应不断加以修正和补充,人们确定了 TF 的核心重要性。在初始阶段,因子 X 和 IX 可以由 TF-VIIa 复合物激活,将内源性和外源性途径联系起来,在放大和传播阶段,凝血酶的快速扩增、凝血因子和细胞相互作用是形成稳定血凝块的必要步骤。简而言之,凝血激活的新模式认为 TF 释放形成少量的凝血酶后,凝血酶进一步激活血小板、VIII、V 因子使得凝血过程加速、规模放大。

2 共同途径中的大分子反应

不管是传统的内源性、外源性凝血,还是 TF 激活的新模式^[18],凝血的最终阶段都包含了凝血酶的生成和三维纤维蛋白网络形成两个阶段。图 2 中列出了凝血共同途径中两种重要的大分子,即凝血酶原和纤维蛋白原的晶体结构图。凝血酶的形成是在 Ca^{2+} 、Xa、Va 和磷脂膜共同作用下,将单链凝血酶原裂解为活化的双链凝血酶;纤维蛋白三维网络的形成过程是纤维蛋白原被凝血酶催化裂解、释放肽段后转化为纤维蛋白单体,在

XIIIa 作用下交联形成稳定结构的纤维蛋白网络,从高分子化学角度看,该过程可分为三个阶段,即纤维蛋白单体的生成、单体的聚合和大分子链交联。

2.1 凝血酶的形成

凝血酶原由 579 个氨基酸残基组成,包含一个可与 Ca^{2+} 结合的 γ -羧化谷氨酸区(Gla_{1-44})、环状 K 区(Kringle, $K1_{45-143}$, $K2_{170-248}$ 区含有可与 Va 相互作用的位点)和一个含有激活区的催化区($A_{272-320}$ 和 $B_{321-579}$)^[19]。图 2 中(1)是凝血酶原 X 射线衍射晶体结构图(无 Gla 区,红色圆圈内表示激活区)。图 3 采用结构简图的形式表示出凝血酶的形成过程。位于凝血酶原 N 端前 40 个氨基酸残基中的 10 个 Gla,通过 Ca^{2+} 与磷脂膜结合;在磷脂膜上,膜结合因子 Xa 及因子 Va 与凝血酶原结合形成凝血酶原复合物,该复合物通过在图中的 I 位点 Arg271-Thr272 以及 II 位点 Arg320-Ser321 处裂解^[20],前者去除了凝血酶原的片段 F1.2,即 Gla-K1-K2,后者形成由二硫键连接的双链(A 链和 B 链),即具有活性的丝氨酸蛋白酶凝血酶 IIa。一旦凝血酶原被激活,凝血酶就可以逃离复合物并自由攻击其底物。凝血酶与丝氨酸蛋白酶高度同源,激活的凝血酶具有 3 个暴露的区域,在活性位点沟中有丝氨酸残基,两个外部位点 I 和 II 具有负电性,往往作为与底物的结合区域。

在纤维蛋白原裂解转化为纤维蛋白单体的反应中,凝血酶外部位点 I 与纤维蛋白 E 结构域结合、外部位点 II 与 γ 链的高亲和力结合,然后活性位点特异性水解纤维蛋白原 α 链和 β 链 N 端 Arg-Gly 酰胺键。除此之外,凝血酶还可促进血小板的释放和粘附、聚集,以加速血液凝固;也可以促进上皮细胞的有丝分裂,缩短创伤愈合时间,因此常用作手术、创伤、生产出血以及各器官部位止血^[21]。

2.2 纤维蛋白单体的形成及聚合

纤维蛋白作为凝血级联反应的产物和纤溶的底物,在止血过程中有着至关重要的作用^[22]。在体内三维纤维蛋白网络的形成以及粘附的血小板、红细胞、白细胞和内皮细胞等组成的血凝块,是血管损伤部位的有益止血过程^[23,24]。纤维蛋白聚合涉及许多连续的反应,每个反应过程都可能带来纤维蛋白网络的结构与性质的改变,从而影响各种疾病的发展走向如癌症、创伤、获得性和遗传性凝血功能障碍以及产科并发症等。

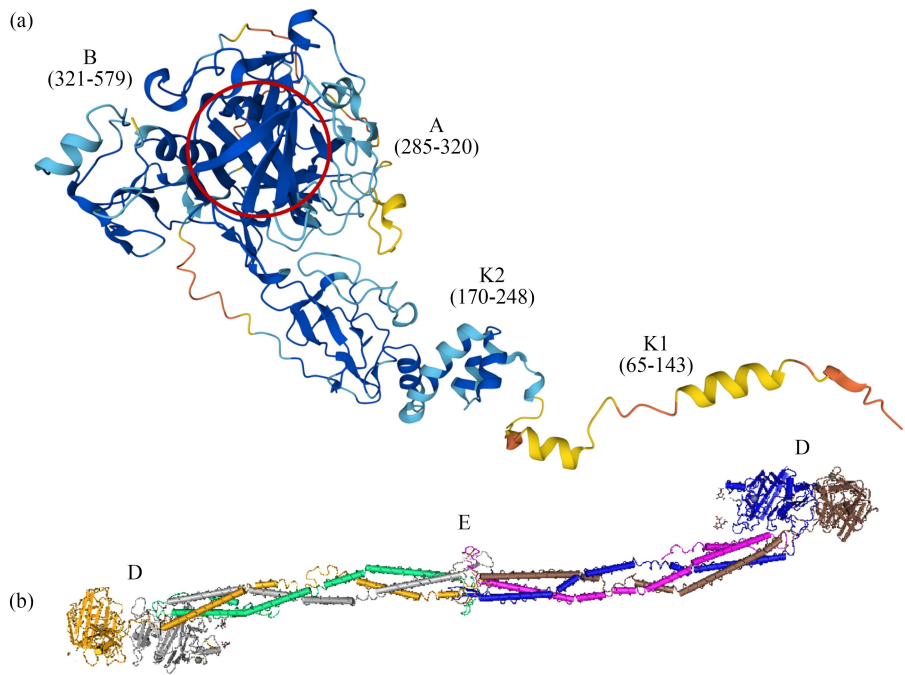


图 2 凝血酶原(a)和纤维蛋白原(b)的晶体结构图(图来自 UniProt 数据库)
Figure 2 The crystal structure diagram of (a) prothrombin and (b) fibrinogen (from UniProt)

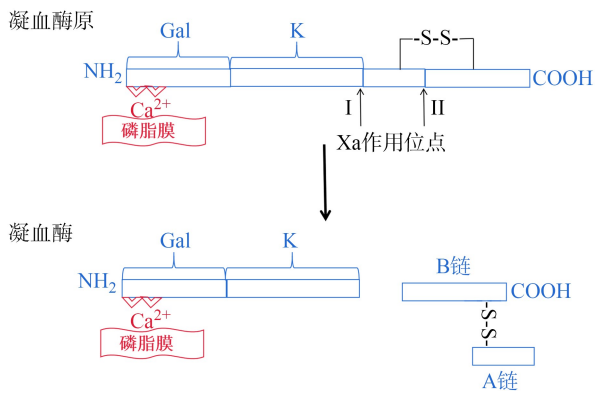


图 3 凝血酶形成的结构简图

Figure 3 Structural diagram of the formation of thrombin

如图 2(b)和图 4 所示,纤维蛋白原是一种结构复杂的二聚体血浆蛋白(340 kDa)^[25],血浆中的含量为 2~4 mg/mL。19 世纪 50 年代,Bailey 等^[26]从纤维蛋白原的 X-射线衍射图谱得出,其分子是由两个相同的亚基构成,每个亚基包含 α 、 β 和 γ 三条肽链,三条多肽链所含的氨基酸数目分别为 1220、922 和 822,链间由 29 个二硫键(—S—S—)连接,其中 3 个二硫键将两个亚基部分相互连接。六条链的 N 端构成纤维蛋白原的 E 域,此处的二硫键分布最多, β 和 γ 链的 C 端组成两个远端的 D 域。每个亚基的 α 、 β 、 γ 链形成一个三链螺旋线团状结构,连接中心 E 和两端 D^[27,28]。

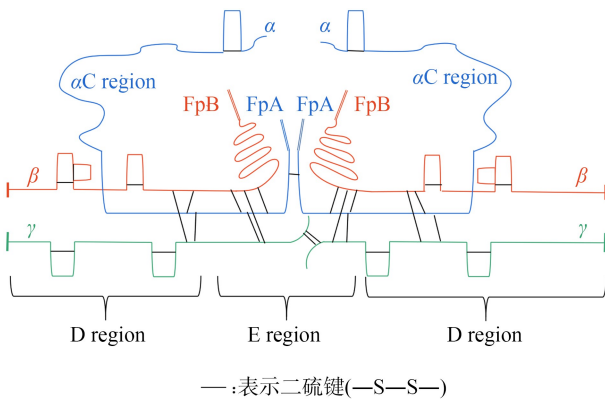


图 4 纤维蛋白原的结构简图

Figure 4 A simple structural diagram of fibrinogen

在纤维蛋白原的 E 域, α 和 β 链上分别存在可被凝血酶裂解的纤维蛋白肽 A(fibrinopeptide A, FpA)(α 1-16)和纤维蛋白肽 B(fibrinopeptide B, FpB)(β 1-14)。图 5 示意图显示了纤维蛋白肽的断裂过程。首先,具有切割序列专一性的凝血酶催化纤维蛋白原 α 链上 N 端的精氨酸(Arg16)-甘氨酸(Gly17)残基之间的肽键断裂,发生 FpA 的脱离,暴露出“A”位点(Gly-Pro-Arg),形成的纤维蛋白单体称为纤维蛋白 I,会自发聚合形成原纤维,但结构松散易被纤溶酶分解^[29,30];同样凝血酶切割 β 链上 N 端 Arg-Gly,释放 FpB,暴露出“B”位点(Gly-His-Arg),产生单体纤维蛋白 II,形成的原纤维会发生横向聚集,结构较紧实耐纤溶酶

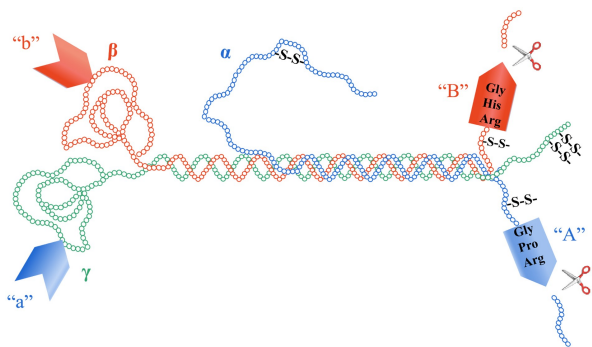


图 5 纤维蛋白原 E 域上纤维蛋白肽 FpA 和 FpB 断裂过程示意图

Figure 5 Schematics of the broken of FpA and FpB from the E region of fibrinogen

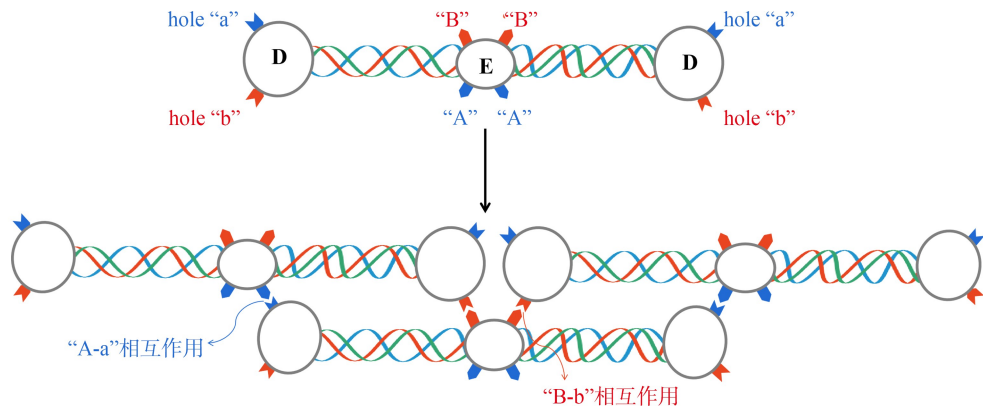


图 6 纤维蛋白单体聚合示意图

Figure 6 Schematic diagram of fibrin polymerization

当形成的低聚体足够大时(20~25 个纤维蛋白单体),可形成双链的原纤维(Protofibril),原纤维是纤维蛋白聚合的关键中间体^[27]。“B”与“b”位点的结合可促进原纤维的横向聚集,促进聚合物的形成^[31,33]。其他已被证明有利于原纤维横向聚集的还有 γ 链的 C 端与相邻的 β 链的相互作用^[34]、不同纤维蛋白分子间的 α C 域相互作用^[35~37]、线团缠结作用,以及 β 链上 Asn364 和 γ 链上 Asn52 残基间的 N-糖胺聚糖作用等^[27]。随着纤维蛋白长度和厚度的增加,纤维束会发生分支。横向聚集有利于形成厚纤维,而分支则易于形成薄层纤维。在纤维蛋白网络中,随着分支点数量的增加,纤维束直径减小,这表明分支和横向聚集具有竞争性。纤维蛋白在谷氨酰转氨酶 XIIIa 作用下,以多肽链中谷氨酰胺残基的 γ -羧酰胺基作为酰基的供体,以赖氨酰残基 ϵ -氨基作为酰基的受体,形成蛋白质分子内和分子间的 ϵ - γ

分解^[27,31,32]。

“A”位点与邻近纤维蛋白单体 D 域的 γ 链上的“a”位点结合,形成“A-a”相互作用,可使得纤维蛋白单体以半交错的方式连接形成二聚体,而将第三个单体加到二聚体上,则会导致两个纤维蛋白单体以头对头方式邻近,“A-a”相互作用使两个纤维蛋白单体 D 域间的相互接触,导致新的二价聚合位点“b”的产生,“b”位点可与 β 链 N 端经裂解产生的“B”位点互相结合,形成 D : E : D 区域间相互作用,进而形成三聚体、四聚体等更大的双链纤维蛋白低聚体。因此“A”与“a”位点的结合促进了纤维蛋白单体分子的线性聚合以及纤维蛋白链的分支^[30],如图 6 所示。

(谷氨酰) 赖氨酸异肽键(isopeptide bonds)^[38],使蛋白质分子发生共价交联。除此之外相邻单体分子 α 链之间、 α 链和 γ 链间也会以同样原理形成酰胺键^[39]。大分子间及内部这种不可逆的交联反应,增强了纤维网络,即凝血块的机械稳定性^[40],也为中风病患血管系统中凝血块的消除带来了困难。

3 结语

凝血级联反应中的大分子反应及结构变化归根结底与有机化学、高分子物理和化学密切相关,凝血因子的激活、凝血酶形成过程均与肽键断裂、大分子构象变化相关。凝血块中纤维蛋白的形成,由纤维蛋白原经肽段催化裂解、暴露出反应位点,形成纤维蛋白单体、再聚合形成网链结构的凝胶。从化学和大分子角度了解凝血级联反应,有助于我们深刻理解凝血、出血等生理和病理现象,以及相关抗凝或溶纤药物的作用原理。

参考文献:

- [1] Laskowski, R. A.; Jabłońska, J.; Pravda, L.; Váreková, R. S.; Thornton, J. M. PDBsum: structural summaries of PDB entries. *Protein Sci.*, **2018**, 27(1), 129-134.
- [2] Rose, P. W.; Bi, C. X.; Bluhm, W. F.; Christie, C. H.; Dimitropoulos, D.; Dutta, S.; Green, R. K.; Goodsell, D. S.; Prlić, A.; Quesada, M.; Quinn, G. B.; Ramos, A. G.; Westbrook, J. D.; Young, J.; Zardecki, C.; Berman, H. M.; Bourne, P. E. The RCSB Protein Data Bank: new resources for research and education. *Nucleic Acids Res.*, **2013**, 41(D1), D475-D482.
- [3] Consortium, W.; Burley, S. K.; Berman, H. M.; Bhikadiya, C.; Bi, C. X.; Chen, L.; Costanzo, L. D.; Christie, C.; Duarte, J. M.; Dutta, S.; Feng, Z. K.; Ghosh, S.; Goodsell, D. S.; Green, R. K.; Guranovic, V.; Guzenko, D.; Hudson, B. P.; Liang, Y. H.; Lowe, R.; Peischach, E.; Periskova, I.; Randle, C.; Rose, A.; Sekharan, M.; Shao, C. H.; Tao, Y. P.; Valasatava, Y.; Voigt, M.; Westbrook, J.; Young, J.; Zardecki, C.; Zhuravleva, M.; Kurisu, G.; Nakamura, H.; Kengaku, Y.; Cho, H.; Sato, J.; Kim, J. Y.; Ikegawa, Y.; Nakagawa, A.; Yamashita, R.; Kudou, T.; Bekker, G. J.; Suzuki, H.; Iwata, T.; Yokochi, M.; Kobayashi, N.; Fujiwara, T.; Velankar, S.; Kleywegt, G. J.; Anyango, S.; Armstrong, D. R.; Berrisford, J. M.; Conroy, M. J.; Dana, J. M.; Deshpande, M.; Gane, P.; Gáborová, R.; Gupta, D.; Gutmanas, A.; Koča, J.; Mak, L.; Mir, S.; Mukhopadhyay, A.; Nadzirin, N.; Nair, S.; Patwardhan, A.; Paysan-Lafosse, T.; Pravda, L.; Salih, O.; Sehnal, D.; Varadi, M.; Váreková, R.; Markley, J. L.; Hoch, J. C.; Romero, P. R.; Baskaran, K.; Maziuk, D.; Ulrich, E. L.; Wedell, J. R.; Yao, H. Y.; Livny, M.; Ioannidis, Y. E. Protein Data Bank: the single global archive for 3D macromolecular structure data. *Nucleic Acids Res.*, **2019**, 47(D1), D520-D528.
- [4] Reinke, J. M.; Sorg, H. Wound repair and regeneration. *Eur. Surg. Res.*, **2012**, 49(1), 35-43.
- [5] Boral, B. M.; Williams, D. J.; Boral, L. I. Disseminated intravascular coagulation. *Am. J. Clin. Pathol.*, **2016**, 146(6), 670-680.
- [6] Iba, T.; Levy, J. H.; Levi, M.; Thachil, J. Coagulopathy in COVID-19. *J. Thromb. Haemost.*, **2020**, 18(9), 2103-2109.
- [7] Miesbach, W.; Makris, M. COVID-19: coagulopathy, risk of thrombosis, and the rationale for anti-coagulation. *Clin. Appl. Thromb. Haemost.*, **2020**, 26, 1-7.
- [8] Iba, T.; Warkentin, T. E.; Thachil, J.; Levi, M.; Levy, J. H. Proposal of the definition for COVID-19-associated coagulopathy. *J. Clin. Med.*, **2021**, 10(2), 191.
- [9] Park, S.; Gu, J. Y.; Kim, H. K. Contact system activation in disseminated intravascular coagulation: activities of prekallikrein and high-molecular-weight kininogen are significant risk factors. *J. Thromb. Thrombolysis*, **2022**, 54(1), 11-14.
- [10] Koupénova, M.; Kehrel, B. E.; Corkrey, H. A.; Freedman, J. E. Thrombosis and platelets: an update. *Eur. Heart J.*, **2017**, 38(11), 785-791.
- [11] Göbel, K.; Eichler, S.; Wiendl, H.; Chavakis, T.; Kleinschnitz, C.; Meuth, S. G. The coagulation factors fibrinogen, thrombin, and factor XII in inflammatory disorders—a systematic review. *Front. Immunol.*, **2018**, 9, 1731.
- [12] Levi, M. Disseminated intravascular coagulation. *Crit. Care Med.*, **2007**, 35(9), 2191-2195.
- [13] Levi, M. Pathogenesis and diagnosis of disseminated intravascular coagulation. *Int. J. Lab. Hematol.*, **2018**, 40, 15-20.
- [14] Levi, M.; de Jonge, E.; van der Poll, T.; ten Cate, H. Disseminated intravascular coagulation. *Thromb. Haemost.*, **1999**, 82(2), 695-705.
- [15] Taylor, F. Jr, Toh, C. H.; Hoots, K.; Wada, H.; Levi, M. Towards definition, clinical and laboratory criteria, and a scoring system for disseminated intravascular coagulation. *Thromb. Haemost.*, **2001**, 86(11), 1327-1330.
- [16] Grover, S. P.; Mackman, N. Tissue factor: an essential mediator of hemostasis and trigger of thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **2018**, 38(4), 709-725.
- [17] Ferrière, S.; Kawecki, C.; Ottavi, J. F.; Denis, C. V.; Kauskot, A.; Christophe, O. D.; Lenting, P. J. A single-domain antibody that blocks factor VIIa activity in the absence but not presence of tissue factor. *J. Thromb. Haemost.*, **2019**, 17(12), 2035-2046.
- [18] Higashi, S.; Matsumoto, N.; Iwanaga, S. Molecular mechanism of tissue factor-mediated acceleration of the intrinsic pathway of blood coagulation.

- ation of factor VIIa activity. *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271(43), 26569-26574.
- [19] Pozzi, N.; Chen, Z. W.; Gohara, D. W.; Niu, W. L.; Heyduk, T.; Di Cera, E. Crystal structure of prothrombin reveals conformational flexibility and mechanism of activation. *J. Biol. Chem.*, **2013**, 288(31), 22734-22744.
- [20] Chinnaraj, M.; Planer, W.; Pozzi, N. Structure of coagulation factor II: molecular mechanism of thrombin generation and development of next-generation anticoagulants. *Front. Med.*, **2018**, 5, 281.
- [21] Al-Amer, O. M. The role of thrombin in haemostasis. *Blood Coagul. Fibrinolysis*, **2022**, 33(3), 145-148.
- [22] Davalos, D.; Akassoglou, K. Fibrinogen as a key regulator of inflammation in disease. *Semin. Immunopathol.*, **2012**, 34(1), 43-62.
- [23] Pieters, M.; Wolberg, A. S. Fibrinogen and fibrin; an illustrated review. *Res. Pract. Thromb. Haemost.*, **2019**, 3(2), 161-172.
- [24] Chapin, J. C.; Hajjar, K. A. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Rev.*, **2015**, 29(1), 17-24.
- [25] Yakovlev, S.; Makogonenko, E.; Kurochkina, N.; Nieuwenhuizen, W.; Ingham, K.; Medved, L. Conversion of fibrinogen to fibrin; mechanism of exposure of tPA- and plasminogen-binding sites. *Biochemistry*, **2000**, 39(51), 15730-15741.
- [26] Bailey, K.; Bettelheim, F. R.; Lorand, L.; Middlebrook, W. R. Action of thrombin in the clotting of fibrinogen. *Nature*, **1951**, 167(4241), 233-234.
- [27] Weisel, J. W.; Litvinov, R. I. Mechanisms of fibrin polymerization and clinical implications. *Blood*, **2013**, 121(10), 1712-1719.
- [28] Riedel, T.; Suttner, J.; Brynda, E.; Houska, M.; Medved, L.; Dyr, J. E. Fibrinopeptides A and B release in the process of surface fibrin formation. *Blood*, **2011**, 117(5), 1700-1706.
- [29] Medved, L.; Weisel, J. W. Recommendations for nomenclature on fibrinogen and fibrin. *J. Thromb. Haemost.*, **2009**, 7, 355-359.
- [30] Budzynski, A. Z.; Olexa, S. A.; Pandya, B. V. Fibrin polymerization sites in fibrinogen and fibrin fragments. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1983**, 408, 301-314.
- [31] Everse, S. J.; Spraggon, G.; Veerapandian, L.; Riley, M.; Doolittle, R. F. Crystal structure of fragment double-D from human fibrin with two different bound ligands. *Biochemistry*, **1998**, 37, 8637-8642.
- [32] Medved, L.; Nieuwenhuizen, W. Molecular mechanisms of initiation of fibrinolysis by fibrin. *Thromb. Haemost.*, **2003**, 89(3), 409-419.
- [33] Yang, Z.; Mochalkin, I.; Doolittle, R. F. A model of fibrin formation based on crystal structures of fibrinogen and fibrin fragments complexed with synthetic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2000**, 97(26), 14156-14161.
- [34] Aleman, M. M.; Walton, B. L.; Byrnes, J. R.; Wolberg, A. S. Fibrinogen and red blood cells in venous thrombosis. *Thromb. Res.*, **2014**, 133, S38-S40.
- [35] Tsurupa, G.; Mahid, A.; Veklich, Y.; Weisel, J. W.; Medved, L. Structure, stability, and interaction of fibrin α C-domain polymers. *Biochemistry*, **2011**, 50(37), 8028-8037.
- [36] Litvinov, R. I.; Yakovlev, S.; Tsurupa, G.; Gorkun, O. V.; Medved, L.; Weisel, J. W. Direct evidence for specific interactions of the fibrinogen α C-domains with the central E region and with each other. *Biochemistry*, **2007**, 46(31), 9133-9142.
- [37] Collet, J. P.; Moen, J. L.; Veklich, Y. I.; Gorkun, O. V.; Lord, S. T.; Montalescot, G.; Weisel, J. W. The α C-domains of fibrinogen affect the structure of the fibrin clot, its physical properties, and its susceptibility to fibrinolysis. *Blood*, **2005**, 106(12), 3824-3830.
- [38] Folk, J. E.; Finlayson, J. S. The epsilon-(gamma-glutamyl)lysine crosslink and the catalytic role of transglutaminases. *Adv. Protein Chem.*, **1977**, 31, 1-133.
- [39] Standeven, K. F.; Carter, A. M.; Grant, P. J.; Weisel, J. W.; Chernysh, I.; Masova, L.; Lord, S. T.; Ariens, R. A. S. Functional analysis of fibrin{gamma}-chain cross-linking by activated factor XIII: determination of a cross-linking pattern that maximizes clot stiffness. *Blood*, **2007**, 110(3), 902-907.
- [40] Walton, B. L.; Byrnes, J. R.; Wolberg, A. S. Fibrinogen, red blood cells, and factor XIII in venous thrombosis. *J. Thromb. Haemost.*, **2015**, 13, S208-S215.