



Doctoral Thesis

An Investigation of the fibrinogen to fibrin transition by means of light scattering

Author(s):

Wiltzius, Pierre

Publication Date:

1981

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000227509> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH Nr. 6764

An investigation of the fibrinogen to fibrin transition by means of light scattering

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY, ZURICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by

W I L T Z I U S P I E R R E

Dipl. Phys. ETH Zürich

born May 13, 1952

in Luxembourg

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. W. Känzig

Prof. Dr. med. P.W. Straub

1981

ABSTRACT

1. Conformational identity of human fibrinogen and monomeric fibrin.

Human monomeric fibrin kept in solution in acidic buffer after thrombin or Reptilase proteolysis was compared to fibrinogen in physiological and acidic buffer by means of dynamic light scattering. The translational and rotational diffusion coefficients of the two monomeric solutions did not significantly deviate from those of fibrinogen in physiological or acidic buffer. It is concluded that no major conformational modification occurs upon release of the fibrinopeptides.

2. The early stages of fibrinogen to fibrin conversion. Size and shape of the first oligomers.

The early steps of fibrin aggregation were studied at physiological fibrinogen concentration. The polymerization was induced using low concentrations of the snake venom Reptilase splitting off the fibrinopeptides A only. In order to obtain information on the size and shape of the first oligomers, the angular dependence of the scattered intensity and the mean Rayleigh line width was measured. Under physiological pH and ionic strength oligomer formation was detectable immediately after enzymatic activation. The comparison of the calculated data for different models (rods, growing spheres, pearl necklaces, random coils) with the experimental results shows that

the early fibrin polymerization proceeds as an end-to-end aggregation of elongated and possibly flexible molecules of approximately 75 nm length.

3. Fibrin aggregation prior to the sol-gel transition.

The light scattering data for the pre-gelation phase were compared with model calculations based on the Flory-Stockmayer distribution which predicts a sol-gel phase transition. This distribution is determined by a parameter λ indicating the extent of aggregation, $\lambda = 0$ corresponding to the monomeric solution and $\lambda = 1$ indicating the sol-gel transition point. Good agreement could be found for 75 nm long monomeric units aggregating: a) end-to-end for the beginning of the aggregation ($0 \leq \lambda \leq 0.3$) and b) in a staggered overlap pattern as proposed by Ferry for the progressing aggregation ($0.3 \leq \lambda < 1$). No systematic difference is observed between the data obtained after activation with thrombin (splitting off the fibrinopeptides A and B) or with Reptilase (splitting off only the fibrinopeptides B) before gelation. This confirms that the release of fibrinopeptide A is the essential prerequisite for the aggregation process.

4. Temperature effects on fibrin(ogen)-fibrin solutions.

Fibrinogen solutions were incubated with small amounts of thrombin. After a certain incubation period at 20°C the enzyme activity was quenched by Hirudin. The light scattering data suggest that the fibrin(ogen)-fibrin aggregates formed at 20°C dissociate reversibly when the temperature rises to 37°C. The degree of

dissociation depends on the amount of polymers formed during the incubation period.

5. A light scattering study on polydisperse TMV solutions.

The applicability of intensity and line width calculations to polydisperse systems has been tested on model distributions of rigid rods. TMV rods were broken up by means of ultrasonic waves and the length distributions for different samples were determined from electron micrographs. Good agreement between the calculated and experimental light scattering data was found.

KURZFASSUNG.

1. Konformationsidentität von menschlichem Fibrinogen und Fibrinmonomer.

Menschliche Fibrinmonomere, welche nach Thrombin- oder Reptilase-Proteolyse in saurem Puffer in Lösung gehalten wurden, wurden mittels dynamischer Lichtstreuung mit Fibrinogen in physiologischem und saurem Puffer verglichen. Die translatorischen und rotatorischen Diffusionskonstanten der beiden Monomerlösungen unterschieden sich nicht signifikant von denjenigen von Fibrinogen in physiologischem und saurem Puffer. Hieraus wird die Schlussfolgerung gezogen, dass nach Abspaltung der Fibrinopeptide keine wesentliche Konformationsänderung stattfindet.

2. Die ersten Stufen der Fibrinogen zu Fibrinumwandlung. Form und Grösse der ersten Oligomere.

Die ersten Schritte der Fibrinaggregation wurden unter physiologischen Fibrinogenkonzentrationen untersucht. Die Polymerisierung wurde mit kleinen Konzentrationen Schlangengift Reptilase, welches nur die Fibrinopeptide A abspaltet, induziert. Die Winkelabhängigkeit der Streuintensität und der mittleren Rayleighlinienbreite wurde gemessen, um Information über Grösse und Form der ersten Oligomere zu erhalten. Unter physiologischen pH- und Ionenstärkebedingungen konnte sofort nach der enzymatischen Aktivierung Oligomerbildung festgestellt werden. Der Vergleich der für verschiedene Modelle (Stäbchen, wachsende Kugeln, Perlenkette, Knäuel) berechneten Daten mit den gemessenen Werten zeigt, dass die frühe Fibrinpolymerisierung eine Ende-zu-Ende Aggregation

von ungefähr 75 nm langen, möglicherweise flexiblen Molekülen ist.

3. Die Fibrinaggregation vor der sol-gel Umwandlung.

Die Lichtstreuendaten der Phase vor der Gelierung wurden verglichen mit Modellberechnungen, die auf der Flory-Stockmayer Verteilung beruhen, welche eine sol-gel Phasenumwandlung voraussagt. Diese Verteilung ist bestimmt durch einen Parameter λ , der ein Mass für die Aggregation ist, $\lambda = 0$ entspricht der Monomerlösung und $\lambda = 1$ gibt den sol-gel Umwandlungspunkt an. Gute Uebereinstimmung konnte für 75 nm lange Monomereinheiten gefunden werden, die folgendermassen aggregieren: a) Ende-zu-Ende am Anfang der Aggregation ($0 \leq \lambda \leq 0.3$) und b) überlappend für die fortschreitende Aggregation ($0.3 \leq \lambda < 1$). Bis zur Gelierung wird kein systematischer Unterschied gefunden zwischen den Daten, welche nach Aktivierung mit Thrombin (spaltet die Fibrinopeptide A und B ab) und denjenigen mit Reptilase (spaltet nur die Fibrinopeptide A ab) erhalten wurden. Dies bestätigt, dass die Abspaltung der Fibrinopeptide A eine wesentliche Voraussetzung für den Aggregationsprozess ist.

4. Temperatureffekte an Fibrin(ogen)-Fibrin Lösungen.

Fibrinogenlösungen wurden mit kleinen Mengen Thrombin inkubiert. Nach einer gewissen Inkubationszeit bei 20°C wurde die Enzymaktivität mit Hirudin gestoppt. Die Lichtstreuendaten zeigen, dass Fibrin(ogen)-Fibrin Aggregate, die bei 20°C gebildet wurden, reversibel dissoziieren, wenn die Temperatur auf 37°C steigt. Der Dissoziationsgrad hängt von der Menge Polymere ab, die

während der Inkubationszeit gebildet wurden.

5. Eine Lichtstreuuntersuchung an polydispersen TMV-Lösungen.

Die Anwendbarkeit von Intensitäts- und Linienbreiteberechnungen auf polydisperse Systeme wurde an Modellverteilungen von starren Stäbchen geprüft. TMV Stäbchen wurden mit Ultraschallwellen gebrochen und die Längenverteilungen verschiedener Lösungen wurden aus Elektronenmikroskopieaufnahmen erhalten. Es wurde gute Uebereinstimmung zwischen den berechneten und experimentellen Lichtstreudaten gefunden.