

The University of South Bohemia  
Faculty of Science



**Hemelipoglycoprotein from the ornate sheep tick,  
*Dermacentor marginatus*: structural and functional  
characterization**

RNDr. Thesis

**Mgr. Jarmila Dupejová**

České Budějovice  
2010

Dupejová, J, 2010: Hemelipoglycoprotein from the ornate sheep tick, *Dermacentor marginatus*: structural and functional characterization. RNDr. Thesis, in English – 28 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Anotation:**

The main aim of this study is the biochemical characterization of a carrier protein from the ornate sheep tick *Dermacentor marginatus*, hemelipoglycoprotein, with emphasis on its size in native conditions, its glycosylation and identification of its modifying glycans, and examining its carbohydrate-binding specificity.

Prohlašuji, že svoji rigorózní práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své rigorózní práce, a to v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

## Article outline

Abstract	2
Background	2
Results	2
Conclusion	3
Background	3
Methods	4
Ticks	4
Plasma and tissue preparation	4
SDS-PAGE and Blue Native/SDS-PAGE electrophoresis	5
Electroelution of HLGP	5
Anti-HLGP and anti-HA polyclonal serum preparation	6
Immunoblotting	6
Schiff staining and lectinoblotting of HLGP	7
Enzymatic deglycosylation	8
Solid-phase permethylation of N-glycans for MS analysis	8
Immunoprecipitation	9
Surface plasmon resonance (SPR)	9
Hemmagglutination assay	9
Mass spectrometry	10
Results	10
HLGP detection and identification in <i>D. marginatus</i> hemolymph	10
Isolation of HLGP	11
Characterization of HLGP	11
Tissue distribution	13
Discussion	13
Conclusion	16
Abbreviations	16
Competing interests	16
Authors' contribution	17
Acknowledgements	17
References	17
Figures	19
Figure 1 – Identification of putative FReD proteins in <i>D. marginatus</i> plasma and detection of HLGP in tick tissues.	19
Figure 2 – 2D and native electrophoreses of plasma proteins and HLGP.	20
Figure 3 – HLGP is a glycosylated protein.	21
Figure 4 – Mass spectra of N-glycans from the purified HLGP and from <i>D. marginatus</i> hemolymph.	22
Figure 5 – HLGP is a carbohydrate-binding protein – HA and SPR.	23
Additional File 1: Table S1.xls	24
Additional File 2: Table S2.xls	24
Additional File 3: Figure S1.pdf	25

**Hemelipoglycoprotein from the ornate sheep tick, *Dermacentor marginatus*: structural and functional characterization.**

Jarmila Dupejova<sup>1</sup>, Jan Sterba<sup>1,2</sup>, Marie Vancova<sup>1,2</sup>, Libor Grubhoffer<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Science, University of South Bohemia, Branisovska 31, CZ-37005 Ceske Budejovice, Czech Republic

<sup>2</sup>Institute of Parasitology, Biology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic, Branisovska 31, CZ-37005 Ceske Budejovice, Czech Republic

\* - corresponding author

e-mail addresses:

JD, e-mail: [dupejova@paru.cas.cz](mailto:dupejova@paru.cas.cz)

JS, e-mail: [sterbaj@paru.cas.cz](mailto:sterbaj@paru.cas.cz)

MV, e-mail: [vancova@paru.cas.cz](mailto:vancova@paru.cas.cz)

LG, e-mail: [liborex@paru.cas.cz](mailto:liborex@paru.cas.cz)

## **Abstract**

### **Background**

Tick carrier proteins are able to bind, transport, and store host-blood heme, and thus they function also as antioxidants. Nevertheless, the role of carrier proteins in ticks is not fully understood. Some of them are found also in tick males which do not feed on hosts to such an extent such as females (there are differences in male feeding in different tick species) and thus they are not dealing with such an excess of heme; some of the carrier proteins were found in salivary glands where the processing of blood and thus release of heme does not occur. Besides, the carrier proteins bind relatively low amounts of heme (in one case only two molecules of heme per protein) compared to their sizes (above 200 kDa).

The main aim of this study is the biochemical characterization of a carrier protein from the ornate sheep tick *Dermacentor marginatus*, hemelipoglycoprotein, with emphasis on its size in native conditions, its glycosylation and identification of its modifying glycans, and examining its carbohydrate-binding specificity.

### **Results**

Hemelipoglycoprotein from *D. marginatus* plasma was purified in native state by immunoprecipitation and denatured using electroelution from SDS-PAGE separated plasma. The protein (290 kDa) contains two subunits with molecular weights 100 and 95 kDa. It is glycosylated by high-mannose and complex *N*-glycans HexNAc<sub>2</sub>Hex<sub>9</sub>, HexNAc<sub>2</sub>Hex<sub>10</sub>, HexNAc<sub>4</sub>Hex<sub>7</sub>, and HexNAc<sub>4</sub>Hex<sub>8</sub>. The purified protein is able to agglutinate red blood cells and has galactose- and mannose-binding specificity. The protein is recognized by antibodies directed against plasma proteins with hemagglutination activity and against fibrinogen-related lectin Dorin M from the tick *Ornithodoros moubata*.

It forms high-molecular weight complexes with putative fibrinogen-related proteins and other

unknown proteins under native conditions in tick plasma. Feeding does not increase its amounts in male plasma. The hemelipoglycoprotein was detected also in hemocytes, salivary glands, and gut. In salivary glands, the protein was present in both glycosylated and nonglycosylated forms.

### **Conclusion**

A 290 kDa hemelipoglycoprotein from the tick *Dermacentor marginatus*, was characterized. The protein has two subunits with 95 and 100 kDa, and bears high-mannose and complex *N*-linked glycans. In hemolymph, it is present in complexes with putative fibrinogen-related proteins. This, together with its carbohydrate-binding activity, suggests its possible involvement in tick innate immunity. In fed female salivary glands, it was found also in a form corresponding to the deglycosylated protein.

## **Abstrakt**

### **Úvod**

Klíštěcí transportní proteiny jsou schopny vázat, přenášet a skladovat hem pocházející z krve hostitele a mohou také fungovat jako antioxidanty. Přesto ale není jejich funkce přesně známá.

Některé z transportních proteinů klíšťat byly nalezeny také u samců, kteří sají menší objem a nemusí tedy zpracovávat tak velké množství hostitelské krve jako samice; některé z nich byly nalezeny ve slinných žlázách, kde se krev ani uvolněný hem nezpracovává. Mimo to, tyto transportní proteiny i přes svou velikost (více než 200 kDa) váží relativně malé množství hemu.

Hlavním cílem této práce je biochemická charakterizace transportního proteinu, hemlipoglykoproteinu, z klíštěte *Dermacentor marginatus* s důrazem na jeho nativní velikost, glykosylaci, identifikaci modifikujících glykanů a vazebnou specifitu pro sacharidy.

### **Výsledky**

Hemlipoglykoprotein z plasmy *D. marginatus* byl purifikován v nativním stavu imunoprecipitací a v denaturovaném stavu elektroelucí z proteinů plasmy rozdělených na SDS-PAGE. Protein (290 kDa) obsahuje dvě podjednotky s molekulovou velikostí 100 a 95 kDa a je glykosylován vysoce manosylovanými a komplexními *N*-glykany HexNAc<sub>2</sub>Hex<sub>9</sub>, HexNAc<sub>2</sub>Hex<sub>10</sub>, HexNAc<sub>4</sub>Hex<sub>7</sub>, a HexNAc<sub>4</sub>Hex<sub>8</sub>.

Purifikovaný protein je schopen aglutinovat červené krvinky a specificky váže galaktózu a manózu. Protein je rozpoznáván protilátkami proti plasmovým proteinům s hemaglutinační aktivitou a proti lektinu Dorinu M z klíšťáka *Ornithodoros moubata* s doménou podobnou fibrinogenu.

Tento protein tvoří v nativních podmínkách vysokomolekulární komplexy s pravděpodobnými proteiny FREP a dalšími neznámými proteiny.

Sání nezvyšuje množství HLGP v plasmě samců. Hemlipoglykoprotein byl detekován také v

hemocytech, slinných žlázách a ve střevě. Ve slinných žlázách byl protein přítomen v glykosylované a neglykosylované formě.

### **Závěr**

290 kDa velký hemlipoglykoprotein z klíštěte *Dermacentor marginatus* byl charakterizován. Protein má dvě podjednotky velké 95 a 100 kDa a nese vysoce manosylované a komplexní *N*-glykany. V hemolymfě je přítomen v komplexech s proteiny rozpoznávanými anti-FREP protilátkami. Tato skutečnost spolu se schopností hemlipoglykoproteinu vázat sacharidy naznačuje zapojení tohoto proteinu v procesech přirozené imunity. Ve slinných žlázách nasátých samic byl hemlipoglykoprotein nalezen také ve formě odpovídající deglykosylovanému proteinu

### **Authors' contribution**

Jarmila Dupejová 50 %  
Ján Štěrba 25 %  
Marie Vancová 15 %  
Libor Grubhoffer 10 %

Manuscript is accepted for publication in journal Parasites & Vectors.