

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Alpha-gal – dvě strany jedné mince

Bakalářská práce

Vypracovala: Klára Šabatková
Školitel: Prof. RNDr. Jan Kopecký, CSc.

České Budějovice
2022

Bakalářská práce:

Šabatková K, 2022: Alpha-gal – dvě strany jedné mince [alpha-gal – Two sides of the same coin. Bc. Thesis, in Czech.] - 59p, Faculty of Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

Ticks are interesting ectoparasites for their ability to modulate the host's defense response. This ability of tick saliva is often exploited by pathogens to increase their transmission. Therefore many researchers focused on identification of molecules in tick saliva and their possible medical use. This thesis focuses on the high natural presence of anti-Gal antibodies in human serum and it's interaction with alpha-gal epitope that is expressed on the surface of some pathogens and mammalian cells. This epitope has been identified in tick saliva and some drugs as well.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala 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 bakalářské 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 jejich 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.

V Českých Budějovicích dne

.....

Klára Šabatková

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala svému školiteli prof. RNDr. Janu Kopeckému, CSc. za odborné vedení a trpělivost v průběhu zpracování bakalářské práce. Také bych chtěla poděkovat svým blízkým a rodině, kteří mě v průběhu psaní podporovali, a především mé mamce, která celou práci průběžně četla a motivovala mě.

Obsah

1	ÚVOD.....	1
2	ŘÁD IXODIDA	2
2.1	OBECNÝ POPIS.....	2
2.2	IXODIDAE	5
2.3	ARGASIDAE.....	6
2.4	NUTTALIELLIDAE	8
3	INTERAKCE KLÍŠTĚ-HOSTITEL.....	8
3.1	SÁNÍ KRVE	8
3.2	OBRANA HOSTITELE.....	9
3.2.1	<i>Hemostáza</i>	<i>9</i>
3.2.2	<i>Imunitní odpověď.....</i>	<i>11</i>
3.3	OBRANA PROTI OBRANĚ	13
3.3.1	<i>Antihemostatické molekuly.....</i>	<i>13</i>
3.3.2	<i>Imunomodulační molekuly.....</i>	<i>14</i>
3.4	PATOGENY A JEJICH PŘENOS.....	18
3.4.1	<i>Slinami asistovaný přenos (SAT)</i>	<i>19</i>
3.5	ZÍSKANÁ REZISTENCE VŮČI KLÍŠTATŮM.....	21
4	ALFA-GAL	22
4.1	VÝSKYT α -GAL EPITOPU A JEHO SYNTÉZA	23
4.1.1	<i>α-gal u klíšťat.....</i>	<i>25</i>
4.2	INAKTIVACE α 1,3GT.....	25
5	KONFLIKT	27
5.1	CETUXIMAB	27
5.2	ALFA-GAL SYNDROM.....	29
5.3	PŘEKÁŽKA V XENOTRANSPLANTACI	33
6	KOOPERACE	34
6.1	ZVÝŠENÍ IMUNOGENICITY VAKCÍN	35
6.2	LÉČBA NÁDORŮ POMOCÍ α -GAL.....	36
6.3	α -GAL NANOČÁSTICE	38
6.4	REZISTENCE VŮČI PATOGENŮM	39
7	DISKUSE	41
8	ZÁVĚR.....	45
9	ABECEDNÍ SEZNAM ZKRATEK	46
10	CITACE	48

1 Úvod

Klíšťata jsou dlouhodobým středem pozornosti zdravotníků, vědeckých pracovníků i veřejnosti. Jakožto vektory široké škály patogenů lidí i zvířat vyvolávají oprávněné obavy. Klíšťata ve svých slinách obsahují tisíce molekul, které jim pomáhají ovlivňovat obranné reakce hostitele. Porozumění mechanismům přenosu patogenů, ale i schopnosti klíštěcích slin ovlivňovat imunologické prostředí hostitele v průběhu krmení, se stalo cílem mnoha výzkumů. Klíšťata ve svých slinách přenášejí i oligosacharid α -gal. Ten je přítomný na povrchu většiny savčích buněk i celé řady patogenů. Lidé jsou jedni z mála savců, kteří sami α -gal nedokáží produkovat. To způsobuje v lidských životech řadu problémů, ale s nimi přichází i řada výhod.

Cílem mé práce je shrnout informace o schopnosti klíšťat ovlivňovat hostitelovy reakce prostřednictvím slin a vysvětlit, jak tento proces usnadňuje přenos virů, bakterií a prvoků. Dále se zaměřuji na molekulu α -gal a anti- α -Gal protilátky, které se v lidském těle tvoří v důsledku syntézy neaktivního enzymu. Následkem klíštěcího kousnutí se může rozvinout alergie na červené maso, tzv. α -gal syndrom. Postižení lidé pak nemohou konzumovat hovězí, vepřové a jiné savčí maso a měli by se vyhýbat některým potravinovým přídatkům a lékům. V poslední části mé práce přináším přehled informací z výzkumů zaměřujících se na využití přirozeně se vyskytujících protilátek, mimo jiné ke zvýšení imunogenicity některých vakcín, léčbě nádorů nebo urychlení hojení popálenin pomocí nanočástic.

Rozšíření informací o výskytu a interakcích α -gal epitopů s lidskými protilátkami skýtá naději mnoha různých použití a překonání překážek spojených s anti- α -Gal protilátkami.

2 Řád Ixodida

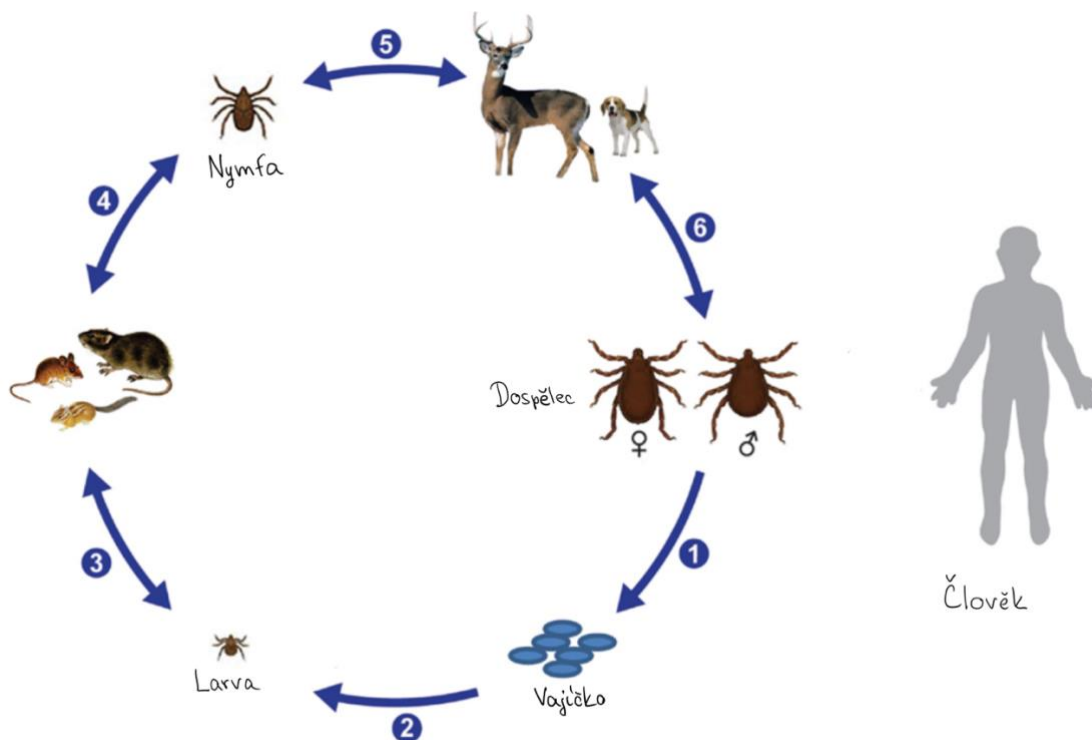
Klíšťata představují řád pavoukovců, který se svým vývojem podobá hemimetabolickému vývoji hmyzu. Hemimetabolický vývoj znamená, že některá nedospělá stádia se svými morfologickými znaky podobají dospělému jedinci (Sonenshine et al. 2014). U klíšťat všech čeledí vývoj probíhá přes čtyři stádia, a to vajíčko, larva, nymfa a dospělec. U argasidních klíšťat se nymfální stádium vývoje svléká dvakrát i vícekrát, u ixoidních klíšťat se nymfa svléká pouze jednou. Ixoidní klíšťata mají jednoduchý gonotrofický cyklus rozmnožování, tzn. že samice se nakrmí pouze jednou, oddělí se od hostitele, naklade tisíce vajíček a zemře. Argasidní klíšťata mají vícenásobný gonotrofický cyklus, kdy se samice může opakovaně krmit na různých hostitelích, po odpojení od hostitele naklade několik desítek až stovek vajíček a cyklus se znova opakuje (Sonenshine et al. 2014).

Délka života klíšťat je jednou z nejnápadnějších charakteristik této třídy pavoukovců. Životní cyklus argasidních klíšťat může být dlouhý i přes dvacet let kvůli několikanásobnému svlékání v nymfálním stádiu a vícenásobnému rozmnožovacímu cyklu, kdy každé z těchto stádií vyžaduje jednotlivou krmnou dávku. Argasidní klíšťata napadají své zdroje potravy většinou v noci, kdy hostitelé odpočívají. Díky tomu, že se svými hostiteli žijí v bezprostřední blízkosti, se nemusejí starat o dostatek potravy. Často s nimi sdílejí příbytek, a tak jejich vývoj není závislý na vnějším prostředí. Toto chování se často označuje jako endofilní a někteří zástupci čeledi Ixodidae se jím také vyznačují (Estrada-Peña et al. 2015). Argasidní klíšťata jsou také schopna vydržet delší dobu hladovění mezi jednotlivými krmícími cykly než ixoidní klíšťata. Délka života ixoidních klíšťat se pohybuje v rozmezí jednoho až tří let (Sonenshine et al. 2014).

2.1 Obecný popis

Ixoidní klíšťata sají pouze jednou v každém ze svých životních stádií. Sání samic se odehrává ve dvou fázích: pomalé sání v prvních 6-9 dnech a rychlé sání podmíněné oplodněním samice. Pro vytvoření velké snůšky je potřeba dostatek proteinů z krve (Estrada-Peña et al. 2015). Samice klade 2000-10000 vajíček do půdy a během několika dní hyne. Samice argasidních klíšťat kladou několik stovek vajíček do vlhkého substrátu a proces krmení, páření a kladení se opakuje. Z vajíček se po přibližně dvou týdnech líhnou šestinohé larvy, které jsou velmi drobné a chybí jim pohlavní otvory a stigmata (Volf et al. 2014). Pokud

larvy klíšťat sají na člověku lze je snadno přehlédnout a v případě přenosu patogenů to může vést k borelióze tzv. bez klíštěte. Po nasátí larva odpadne a přechází do stadia metamorfózy. Ixoidní klíšťata mají pouze jedno nymfální stádium. U argasidních klíšťat je počet stádií proměnlivý. Záleží zejména na daném druhu a teplotě. Každé ze stádií metamorfózy vyžaduje většinou jedno nakrmení (Sonenshine et al. 2014).



Obrázek 1: Životní cyklus ixoidních klíšťat. (1) kladení vajíček nakrmenou samicí; (2) vylíhnutí larev z vajíček; (3) larvy se krmí na malých zvířatech; (4) nakrmené larvy se přeměňují v nymfy; (5) nymfy se krmí na větších i malých zvířatech; (6) nymfy se mění v dospělé a krmí se na větších zvířatech i lidech. (převzato a upraveno z Ereemeeva et al. 2015)

Tělo dospělých klíšťat se skládá z části hlavové, tzv. gnathosoma, vlastní části těla zvané idiosoma a končetin. Velikostně se pohybují mezi 2-7 mm v nenakrmeném stavu. Velikost se mění v závislosti na druhu a pohlaví. Larvy jsou obecně menší než nymfy, dospělci větší než nymfy a samci menší než samice. Po nasátí může klíště měřit i více než 1 cm.

Gnathosoma je zatažitelná hlava s ústním ústrojím, které obvykle nese makadla (palpy) podobající se končetinám, a klepítka (chelicery), které mohou být u některých druhů přeměněny ve specializované útvary pro sání krve. Palpy mají pro klíště senzoričnou funkci a

slouží k vyhledání nejvhodnějšího místa pro přísátí. V gnathosomě se dále vyskytuje pro klíšťata typický hypostom, který je pokrytý dozadu otočenými zoubky sloužícími k přichycení klíšťete ve tkáni hostitele při procesu sání krve. Přední část ústního ústrojí je tvořena chelicerami, které proniknou pod pokožku hostitele (Volf et al. 2007). Chelicery se následně roztáhnou do tvaru písmene V a působí jako háček držící klíšťe na místě. Podoba hypostomu se může lišit mezi čeleděmi Ixodida, ale i mezi pohlavími (Sonenshine et al. 2014). Samci rodu *Ixodes* využívají hypostom při specifickém způsobu rozmnožování, tzv. traumatické inseminaci, kdy samec do hypostomu nasaje vlastní pohlavní buňky a následně je přenese do pohlavního otvoru samice. (Volf et al. 2007). Gnathosoma nemůže být považována za hlavu v pravém slova smyslu, jelikož neobsahuje oči ani mozek.

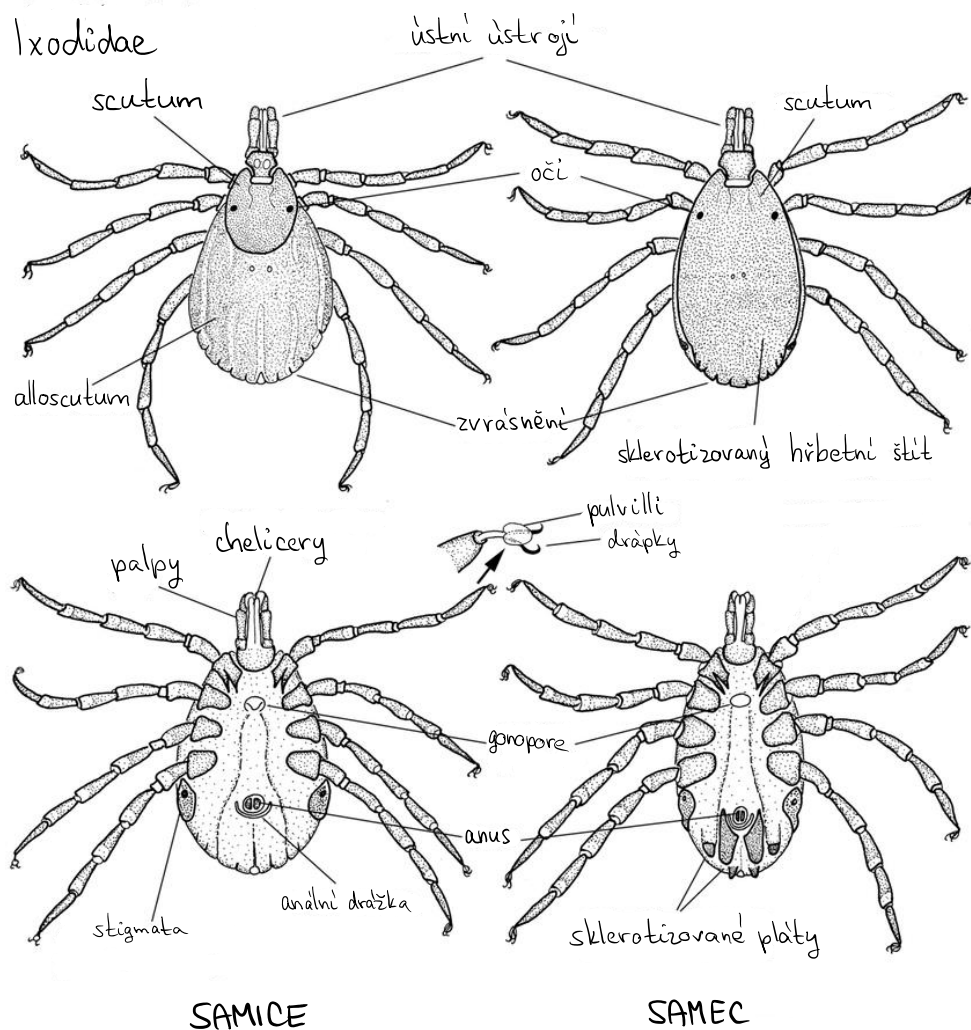
Idiosoma je vlastní tělo klíšťete. Idiosoma je rozdělena na dvě části. Anteriorní segment, tzv. podosoma, nese čtyři páry končetin a gonopore, což je otvor s vyústěním pohlavních orgánů samců i samic. Posteriovní část těla, tzv. opistosoma nese štít – scutum, který je u některých druhů sklerotizovaný. Zbytek těla je pokryt měkkou pokožkou, která umožňuje mnohonásobné zvětšení objemu těla při kmení. V larválním stádiu mají klíšťata tři páry nohou, v nymfálním a dospělém jsou to čtyři páry. Každá končetina je složena ze sedmi segmentů a zakončena dvojicí drápků (Sonenshine et al. 2014). Obvykle nesou končetiny smyslové a hmatové chloupky, které pomáhají klíšťatům orientovat se v prostoru, vyhledávat hostitele i vhodné místo na jeho pokožce. Na tarzálních člancích předních párů končetin se nachází důležitý orgán, tzv. Hallerův orgán, který pomáhá klíšťatům identifikovat hostitele. Hallerův orgán má podobu jamek se smyslovými brvami, které umožňují klíšťeti detekovat teplo a metabolity vydávané hostitelem, především oxid uhličitý. Klíšťata dokážou pomocí sensorických brv rozpoznávat také teplotu a proudění vzduchu. Hallerův orgán u některých rodů klíšťat (například rodu *Ixodes*) nahrazuje funkci očí, které u těchto rodů mohou zcela chybět (Volf et al. 2007).

Na břišní straně za čtvrtým párem končetin je umístěn jeden pár dýchacích otvorů - stigmat. Klíšťata dýchají vzdušnicemi. Dalšími vnitřními orgány klíšťat jsou trávicí ústrojí, Malphigické trubice, synganglion (centrální nervový systém), reprodukční orgány a slinné žlázy (Sonenshine et al. 2014). Vnitřní orgány klíšťat jsou omývány volně cirkulující hemolymfou obsahující hemocyty a proteiny. Hemolymfa slouží k distribuci živin a odvodu odpadních látek. Také je důležitou součástí vnitřní imunity klíšťat (Sonenshine et al. 2014).

2.2 Ixodidae

Nejvýraznějším znakem odlišujícím čeled' Ixodidae od ostatních klíšťat je sklerotizovaná kutikula s chitinizovaným štítem, který u samců pokrývá celou hřbetní část těla. U samic, nymf a larev je omezen na polovinu až třetinu povrchu hřbetu. Díky tomu může samice při sání krve až několikanásobně zvětšit objem těla a zajistit si tak dostatečný přísun potravy pro kladení vajíček, popřípadě pro růst mezi jednotlivými stádii. Samec může kvůli chitinizovanému štítu při jednom krmení přijmout pouze omezené množství krve (Sonenshine et al. 2014). Klíšťata čeledi Ixodidae způsobují hostiteli téměř vždy bezbolestné kousnutí. Po proniknutí do kůže hostitele produkuje parazit cement, kterým stabilizuje polohu hypostomu v ráně. Díky takto pevnému přichycení se mohou zástupci čeledi Ixodidae na hostiteli krmit v řádu dnů až týdnů.

Do čeledi Ixodidae patří až 700 druhů klíšťat, které jsou dále rozděleny do dvou skupin: Prostriata s rodem *Ixodes* a Metastriata s rody *Amblyomma*, *Dermacentor* a *Rhipicephalus* (Anderson et al. 2004). V dospělosti jsou jedinci tříd Metastriata a Prostriata snadno odlišitelní. V larválním a nymfálním stádiu se rozpoznávají podle anální drážky, což je záhyb nacházející se v blízkosti análního otvoru. U skupiny Prostriata se drážka nachází před análním otvorem, zatímco skupina Metastriata má drážku za análním otvorem nebo úplně chybí. Problém nastává u nedospělých stádií jednotlivých rodů skupiny Metastriata. K jejich odlišení se používá vyvinutý diagnostický test multiplexové PCR (Anderson et al. 2004). Dospělí samci skupiny Prostriata až na výjimky nepřijímají potravu. Hypostom rodu *Ixodes* může být redukován a délka jejich života je mnohem kratší než u samců skupiny Metastriata (Sonenshine et al. 2014).



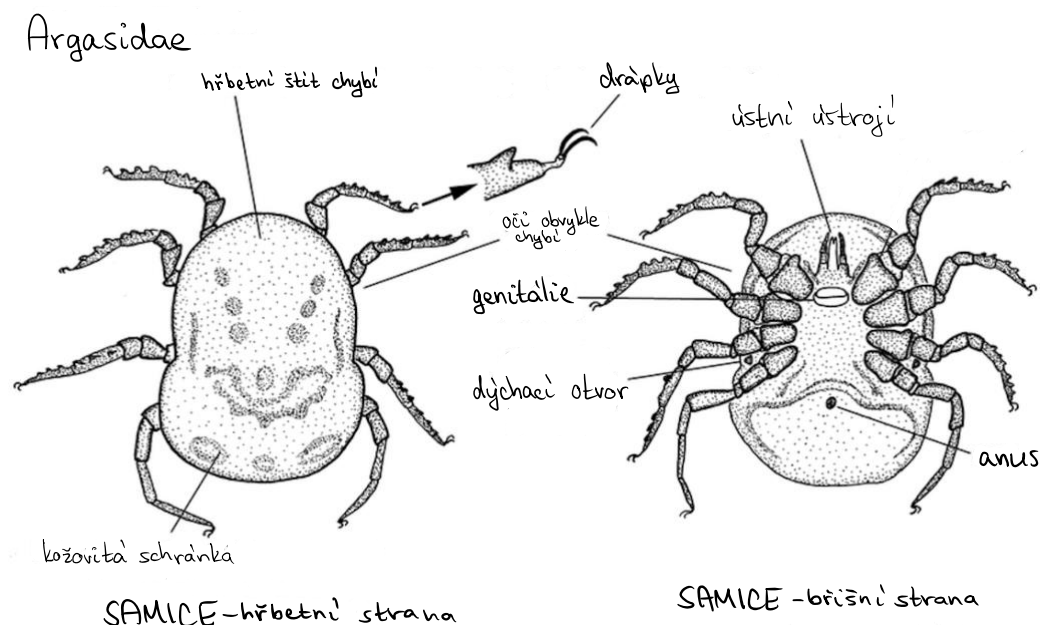
Obrázek 2: Morfologický popis čeledi Ixodidae na příkladu dospělého samce a samice rodu *Hyalomma*. (převzato a upraveno z Barker et al. 2014)

2.3 Argasidae

Argasidní klíš'ata nemají chitinizovaný štít v žádném vývojovém stádiu. Při pohledu shora mají gnathosomu zcela zakrytou idiosomou. Nymfy a dospělci obou pohlaví mají stejné morfologické znaky. Liší se pouze strukturou genitálních otvorů. Nymfy ovšem postrádají genitální otvory. Nymfy i dospělci mají ústa posazená na spodní straně těla uvnitř prohloubeniny zvané camerostom. Larvy argasidních klíš'at mají anteriorně situovaná ústa, čímž se podobají ixoidním larvám (ixoidní larvy ale většinou mají dorsální štít). Oči jsou posazeny po stranách těla a stigmata vzdušnic se otevírají mezi třetím a čtvrtým párem končetin. Tělo pokrývá kožovitá schránka, která se dokáže výrazně roztahovat. To umožňuje

jedincům až desetinásobně zvětšit objem svého těla v průběhu několika málo hodin, občas minut. Při sání krve vypouštějí přebytečnou vodu pomocí Malphigických trubic umístěných v pánevní dutině. Larvální stádium čeledi Argasidae se od nymf a dospělců výrazně liší v délce krmení. Larva se na hostiteli krmí ve značně delší časové periodě v řádu několika dnů, zatímco u nymf a dospělců netrvá krmení déle než několik hodin. Díky tomu je mnohem snadnější pozorovat argasidní jedince v larválním stádiu a u některých druhů je to dokonce jediné pozorované stádium.

Do čeledi Argasidae bylo zatím zařazeno něco málo pod 200 zástupců, nicméně metody molekulární biologie pomáhají poznávat a zařazovat stále nové druhy, takže celkově třída není zatím ustálená. Nyní má čeleď Argasidae 5 podčeledí, a to *Antricolinae*, *Argasinae*, *Nothoaspininae*, *Ornithodorinae* a *Otobinae*. Argasidae jsou velmi četnou čeledí v jižní Asii, kde je obecně největší biodiverzita druhů klíšťat. Vyskytuje se zde až 96 druhů čeledi Argasidae. Klíšťákovití jsou velmi rezistentní vůči vyschnutí a mohou žít až několik let v suchých podmínkách. V České republice se nejčastěji vyskytuje klíšťák holubí, *Argas reflexus*, napadající příležitostně člověka.



Obrázek 3: Morfologický popis čeledi Argasidae na příkladu dospělé samice rodu *Ornithodoros*. (převzato a upraveno z Barker et al. 2014)

2.4 Nuttalliellidae

Do čeledi Nuttalliellidae patří jediný zástupce *Nuttalliella namaqua* vyskytující se v oblastech Tanzanie až Namibie a v jižní Africe. Od ixoidních a argasidních klíšťat se liší pozicí stigmat vzdušnic, kožovitým povrchem těla a pseudoscutem se zdrsňeným povrchem. Ústa a hypostom jsou umístěna dorsálně (Sonenshine et al. 2014). Čeď Nuttalliellidae je nejbazálnější linií klíšťat a morfologicky stojí na pomezí mezi čeleděmi Ixodidae a Argasidae.

3 Interakce klíště-hostitel

Všechny čeledi klíšťat jsou obligátními ektoparazity, jejichž jediným zdrojem energie a živin je krev obratlovců. Klíšťata patří do skupiny thelmofágů, což je skupina hematofágů sajících přímo z drobných hematomů, které se tvoří z krve vylité z poškozené cévy. Rána vznikající po proniknutí hypostomu do tkáně hostitele narušuje vrstvu epidermis a proniká do dermis. To stimuluje obrannou reakci hostitele – svědění, bolest, zánět, hemostázu a iniciaci imunitní odpovědi. Klíštěcí sliny jsou vypouštěny do místa poškození, zejména do epidermis a zároveň zachycovány vrstvou vytvořeného cementu (Allen et al. 1979).

3.1 Sání krve

Sání zástupci čeledi Ixodidae je dlouhodobý proces trvající několik dní. Klíšťata mají velké slinné žlázy, které produkují sliny obsahující látky inhibující a modulující obranné reakce hostitele. To jim dává dost času na krmení, aniž by si toho hostitel musel všimnout. Hypostom ixoidních klíšťat je přizpůsobený dlouhodobému krmení (Binnington et al. 1980). Spousta druhů ixoidních klíšťat vytváří cement polymerizací proteinů bohatých na glycin, které jsou tvořeny na počátku uchycení klíštěte (Suppan et al. 2018). Tvorba cementu klíšťatům umožňuje udržet se na místě v průběhu sání a zároveň zaručuje, že krmení nebude mít ztráty prosáknutím (Kemp et al. 1982).

Sání klíšťáky čeledi Argasidae je mnohem kratší, v řádu několika hodin. Klíšťáci mají kromě slinných žláz také koxální (kyčelní) žlázy. Chelicery argasidních klíšťat jsou robustní, uzpůsobené k rychlejšímu proniknutí do pokožky (Binnington et al. 1980).

Protože sání klíšťat čeledi Ixodidae trvá několik dní, musí tak překonat obranné mechanismy hostitele zahrnující hemostázu, akutní zánět a specifickou imunitní odpověď. Z toho důvodu mají klíšťata ve svých slinách množství farmakoaktivních molekul, které

uvolňují do tkáně hostitele v procesu krmení. Tato modulace imunitního systému hostitele umožňuje snadnější přenos patogenů z klíštěte na hostitele během krmení (Glatz et al. 2017).

3.2 Obrana hostitele

Jak již bylo zmíněno výše, hostitel na kousnutí reaguje obrannými mechanismy v podobě hemostáze a imunitní odpovědi. Hemostáza je proces zabraňující ztrátám krve, který se spouští poškozením epitelu cévy. Imunitní odpověď je reakce sestávající ze specifické a nespecifické imunity. Nejprve nastupuje nespecifická imunitní odpověď zahrnující zánět (komplement), žírné a dendritické buňky, granulocyty, proteiny akutní fáze zánětu, makrofágy a NK buňky. Při opakovaném sání je aktivována specifická imunitní odpověď zahrnující T a B buňky a paměťové buňky, které umožňují specifičtější a efektivnější obranu proti danému antigenu.

3.2.1 Hemostáza

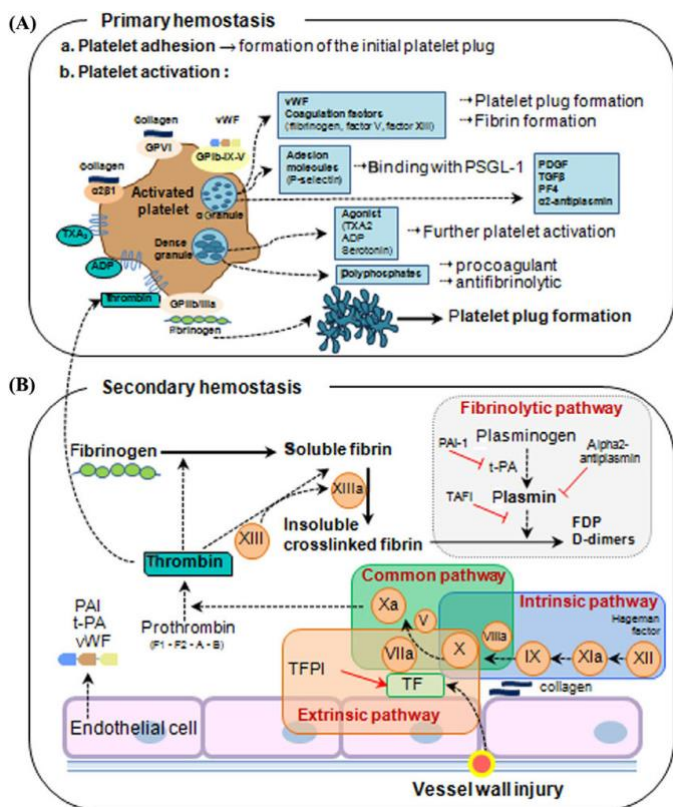
Hemostáza je primární obranný systém oběhové soustavy, který nastupuje po poranění cévy a brání ztrátám krve. Hemostáza zahrnuje primární hemostázu, hemokoagulaci a fibrinolýzu.

Kousnutím klíště poraní malé cévky v místě vniknutí hypostomu. V rádech zlomků sekund se spouští proces primární hemostázy. Té se účastní cévní stěna a krevní destičky. Poraněním dochází k obnažení subendoteliálních struktur cévní stěny obsahujících kolagen. Výsledkem reflexivní činnosti svalové vrstvy cévy dochází k vazokonstrikci. Trombocyty prostřednictvím receptorů glykoproteinové povahy (GP) adherují ke kolagenním vláknům obnažené matrix (GP Ia/IIa/IIb a GP Ib/V/IX) (Šlechtová 2007). Působení biologicky aktivních molekul zahrnujících epinefrin, ADP – adenosindifosfát, kyselinu arachidonovou, kolagen nebo trombin stimuluje trombocyty k vypuštění obsahu granul – malých váčků v buňkách obsahujících farmakoaktivní látky (ADP, tromboxan A a trombin) (Lee et al. 2003). Bylo zjištěno, že slabými stimuly přednostně dochází k vypouštění obsahu denzních tělísek, zatímco silnými stimuly dochází také v uvolnění obsahu alfa-granul. Adhezí se změnil tvar trombocytů z diskoidního na sférický a společně s aktivací GP receptoru se spouští kaskáda biochemických dějů, při nichž dojde k aktivaci trombocytů. Změnou tvaru dochází k přesunu fosfatidylserinu a fosfatidylinositolu z vnitřní membrány na vnější membránovou strukturu. Tento přesmyk, spojený se změnou náboje destiček, se nazývá flip-flop (Šlechtová 2007).

Obnaží se další glykoproteinové receptory - GP IIb/IIIa a pomocí adhezních proteinů (fibrinogen, trombin, vWf, vitronektin) se aktivují receptory destiček vázající fibrinogen, čímž spouštějí jejich agregaci. Vytváří se primární bílý rozpustný trombus (Šlechtová 2007).

Agregace destiček je v přímém spojení s dalším mechanismem hemostázy – hemokoagulací, jejíž výsledkem je přeměna rozpustného fibrinogenu na nerozpustný fibrin, a tím vytvoření stabilního fibrinového koagula. Hemokoagulace se účastní látky označované jako koagulační faktory I-XII. Většina koagulačních faktorů je syntetizována v játrech. Jejich aktivní forma se označuje písmenem „a“. Kromě tkáňového faktoru (TF) a malého množství faktoru VIIa kolují všechny koagulační faktory plazmou ve formě proenzymů a pro svou aktivaci vyžadují proteolytické štěpení (Lee et al. 2003). Prvním krokem hemokoagulace je tvorba aktivátoru protrombinu z faktoru X a V. Přítomnost enzymu trombinu vznikajícího z protrombinu je esenciální pro přeměnu fibrinogenu na fibrin. Aktivátor protrombinu vzniká vnější nebo vnitřní hemokoagulační kaskádou. Vnitřní hemokoagulační kaskáda počíná aktivací faktoru XII, zatímco vnější zahrnuje primární aktivaci faktoru III (tkáňového tromboplastinu). Kaskádou aktivací dalších faktorů se aktivují faktory Xa a Va, které tvoří aktivátor protrombinu. Obě cesty aktivace vyžadují přítomnost vápenatých kationtů a destičkových fosfolipidů (Penka et al. 2011). Následuje vznik trombinu štěpením plazmatického faktoru II (protrombinu) působením komplexu aktivátoru protrombinu, membránových fosfolipidů a vápenatých iontů. Katalytickým působením trombinu dochází k odštěpení fibrinopeptidu A a fibrinopeptidu B, čímž vzniká fibrin monomer, který polymerizuje za vzniku fibrinové sítě. Její stabilizaci zajišťuje aktivovaný FXII (fibrin stabilizující faktor) za účasti Ca^{2+} kovalentním provázáním jednotlivých řetězců (Šlechtová 2007).

Fibrinolýza je vedlejším, ale neméně důležitým dějem hemostázy. Zahrnuje štěpení nerozpustného fibrinu plazminem. Plazmin vzniká aktivací plazminogenu – neaktivního plazmatického prekurzoru plazminu. Ten je aktivován aktivátory plazminogenu (t-PA, u-PA) nebo inhibován inhibitory plazminogenu (TFPI, systém proteinu C, antitrombin, heparinový kofaktor II). Aktivovaný plazmin následně štěpí fibrin na tzv. fibrin degradační produkty. Konečným produktem štěpení jsou D-dimery (Penka et al. 2011). Za fyziologických podmínek udržuje celý systém hemostázy hemostatickou rovnováhu, tzv. fluido-koagulační rovnováhu – nedochází ani ke krvácení, ani k uzávěru cév (Šlechtová 2007).



Obrázek 4: Přehled primární a sekundární hemostáze. (převzato z Repetto et al. 2017)

3.2.2 Imunitní odpověď

Imunitní systém (IS) se u obratlovců výrazněji rozvinul kvůli obraně hostitele před různorodou škálou patogenů, které se neustále vyvíjejí, tudíž i imunitní systém musí být dostatečný. IS také pomáhá hostiteli eliminovat toxiny a nebezpečné substance, které se do těla dostávají mukózními povrchy. Pro imunitní systém je klíčové rozpoznání vlastního a cizího. Na obraně se podílejí dva typy imunity – specifická (adaptivní) a nespecifická (přirozená) (Chaplin et al. 2010). Imunitní systém obratlovců je unikátní právě díky přítomnosti adaptivní imunity. Klíčící kousnutí spouští hemostatickou reakci, se kterou spolupracuje imunitní odpověď. Přirození hostitelé klíšťat reagují na kousnutí klíštěte lehkou imunitní odpovědí, kdežto u arteficiálních hostitelů může imunitní reakce probíhat velmi bouřlivě.

Přirozená složka imunitní odpovědi je evolučně starší. Rychle rozpoznává a neutralizuje širokou škálu patogenů bez ohledu na předchozí expozici. Rozpoznává odlišnosti na molekulární úrovni, které se nevyskytují v savcích, ale jsou společné pro mnoho mikrobů a toxinů, a využívá molekuly exprimované ve velkém množství buněk, tudíž je její reakce rychlá

a silná (Chaplin et al. 2010). Přírozená imunita zahrnuje anatomickou a fyziologickou bariéru, fagocytární a endocytickou bariéru zajišťovanou makrofágy, žírnými buňkami, NK buňkami a granulocyty, převážně pak bazofily a neutrofile. Dále se nespecifické imunitní odpovědi účastní složky komplementu, které vytvářejí zánětlivou bariéru a tzv. proteiny akutní fáze zánětu. Přírozená imunita také zahrnuje rozpustné proteiny a malé bioaktivní molekuly, které jsou buď konstantně přítomné v tělních tekutinách (proteiny komplementu, defensiny a ficoliny 1-3) anebo sekretované buňkami při jejich aktivaci (cytokiny, chemokiny, lipidové mediátory, reaktivní volné radikály a bioaktivní aminy a enzymy přispívající tkáňovému zánětu) (Holmskov et al. 2003). V neposlední řadě přírozená imunita zahrnuje receptory a cytoplazmatické proteiny, které váží molekulární epitopy na povrchu invadujících mikrobů. Některé části přírozené imunity jsou neustále aktivní, jiné jsou aktivované následkem interakce hostitelské buňky či tkáně s chemickými strukturami charakteristickými pro invadující patogeny (Chaplin et al. 2010).

Adaptivní imunita využívá molekuly zakódované v genových odpovědích, které se somaticky vyvíjejí, aby vytvořili antigen-vazebné molekuly se specifitou pro danou individuální cizí strukturu patogenu či toxinu. Síla adaptivní odpovědi roste s opakovaným vystavením se patogenům. Adaptivní imunita využívá menšího počtu buněk, zejména pak T a B-lymfocytů a jejich antigen-specifických receptorů (Joshi a Kaech 2008). Složení antigenního receptoru z kolekce několika stovek genových elementů dovoluje formaci milionu různých náhodných antigenních receptorů, každý s potenciálem unikátní specifity proti různým antigenům. Pomocí dalších mechanismů se z obrovského množství náhodně generovaných potenciálních receptorů vybere řádně fungující repertoár B a T-buněk (Chaplin et al. 2010).

Fagocytické buňky monocytární a makrofágové linie hrají klíčovou roli v adaptivní imunitě díky jejich schopnosti pohlcovat antigeny a rozkládat je proteolýzou na peptidové fragmenty, které následně prezentují T-buňkám a mohou je tak aktivovat. Fungují jako antigen-prezentující buňky – APC. Dalšími buňkami této linie jsou Langerhansovy buňky v epidermis, Kupfferovy buňky v játrech a mikrogliaální buňky v nervovém systému. Nejpotentnějšími antigen-prezentujícími buňkami jsou dendritické buňky – DC, které jsou přítomné ve všech tělních tkáních a koncentrují se v sekundárních lymfatických orgánech. Pro každý individuální patogen, toxin nebo alergen musí buňky adaptivní imunity proliferovat, aby zajistily dostatečné množství buněk specifických pro daný antigen. Klíčovou funkcí adaptivní imunity

je produkce dlouhověkých paměťových buněk, které dokážou rapidně reexprimovat efektorovou funkci při dalším setkání se stejným patogenem, někdy i o desítky let později (Chaplin et al. 2010).

Přirozená a adaptivní imunita fungují proti patogenům dohromady, s tím, že přirozená imunita zajišťuje primární imunitní odpověď v řádu několika minut po napadení neznámým patogenem a adaptivní imunita následuje jako sekundární odpověď později, kdy antigen-specifické T a B buňky získaly čas na klonální expanzi proti specifickému antigenu (Chaplin et al. 2010).

3.3 Obrana proti obraně

Hematofágové musejí překonat ochranné bariéry hostitele, aby se mohli nakrmit krví a postoupit v životním cyklu k rozmnožování. Téměř všechen krevsající hmyz obsahuje ve svých slinách alespoň jednu protizánětlivou sloučeninu, jednu antikoagulační sloučeninu a jeden vazodilatant (Wikel et al. 2013). V mnoha případech obsahují širší škálu molekul (Riberio et al. 1995). Tyto sloučeniny jim pomáhají překonat imunologické a hematologické bariéry hostitele. Všechna klíšťata narušují při sání hypostomem pokožku hostitele a krmí se z kapky vytékající krve. Mezi jednotlivými druhy existují odchylky v hloubce penetrace ústního ústrojí a produkci cementu. Dle hloubky proniknutí ústního ústrojí jsou sliny vpraveny buď na hranici epidermis-dermis nebo hlouběji do dermis (Moorhouse et al. 1969). Klíšťata jsou ve skupině hematofágů výjimečná dobou sání na hostiteli. V důsledku toho si vyvinula silnou obranu proti defenzivě hostitele. Chemické složení klíštěcích slin dokáže ovlivnit svědění, bolest, hemostázu, zánět, adaptivní a přirozenou imunitu i hojení ran. To dává klíšťatům možnost krmení v delší časové periodě, ale také ideální podmínky pro přenos široké škály patogenů (Wikel et al. 2013).

3.3.1 Antihemostatické molekuly

Klíštěcí sliny obsahují vysoké množství inhibitorů proteáz, vazodilatanty, inhibitory destičkových aktivátorů a látky ovlivňující koagulaci, které jim pomáhají v potlačení hemostáze. Neproteinovými vazodilatanty v klíštěcích slinách jsou prostaglandiny a prostacyklin (Riberio et al. 1992, Riberio et al. 1988). Protein HRF (histamine releasing factor) ze slin klíštěte *I. scapularis* a inhibitor serinových proteáz nalezený ve slinách *I. ricinus*

přispívají k vazodilataci a inhibují krevní srážení (Dai et al. 2010, Chmelar et al. 2012). Ve slinách klíštěte *I. ricinus* se vyskytuje velké množství specifických inhibitorů proteáz (Francischetti et al. 2002). Modulace koagulační kaskády slinami klíšťat se často soustředí na faktor Xa (Ibrahim et al. 2001). Klíštěcí sliny silně inhibují trombocyty hydrolýzou ADP. Hydrolýza ADP snižuje kolagenem indukovanou aktivaci destičkových receptorů a jejich agregaci. Zároveň inhibuje agregaci destiček trombinem.

Reparační procesy zahrnující angiogenezi a hojení ran jsou pro klíště, které se krmí i několik týdnů, velkou výzvou. Lacerace pokožky okamžitě zprostředkovává kontakt ústního ústrojí klíštěte s keratinocyty – buňkami exprimujícími receptory vrozené imunity, antimikrobiální peptidy a prozánětlivé cytokiny (Nestle et al. 2009). V epidermis se dále nacházejí Langerhansovy buňky, které pohlcují antigeny klíštěcích slin a patogenů, putují do lymfatických uzlin a prezentují je T-lymfocytům (Merad et al. 2008). Dendritické buňky jsou důležitým spojníkem přirozené a adaptivní imunity. Klíštěcí sliny inhibují produkci cytokinů IL-6, IL-12, TNF, IFN- β a chemokinu RANTES (Oliveira et al. 2008, Sá-Nunes et al. 2007). Dále upravují expresi CCR5 a CCR7, čímž inhibují migraci, proliferaci, maturaci (u klíštěte *A. cajennense*) a fagocytózu dendritických buněk (Oliveira et al. 2008, Carvalho-Costa T et al. 2015).

3.3.2 Imunomodulační molekuly

Všechna klíšťata ve svých slinách obsahují imunomodulační molekuly. Dohromady mají klíšťata inhibiční nebo modulační strategie chránící je před všemi hlavními obrannými mechanismy hostitelů (Hovius 2009).

Komplement je prvním obranným mechanismem přirozené imunity. Je to systém aktivovaný třemi cestami: klasická, alternativní a lektinová. Ty se sbíhají v konverzi C3 složky na C3a a C3b. Obecně se klíšťata zaměřují na blokaci alternativní cesty aktivace komplementu. Konkrétní inhibitory závisí na druhu klíštěte a jeho běžném hostiteli (Wikel et al. 2013). *I. scapularis* obsahuje ve svých slinách anti-komplementovou molekulu ISAC o velikosti 18kDa (Valenzuela et al. 2000). ISAC disociuje faktor Bb od C3b v alternativní cestě aktivace komplementu C3 konvertázou (Valenzuela et al. 2000). Podobně funguje i protein H, který ovšem dokáže inhibovat i klasickou cestu komplementu (Zipfel 1999). Antikomplementární proteiny klíštěte *I. ricinus* jsou inhibitory specificky vážící pozitivní

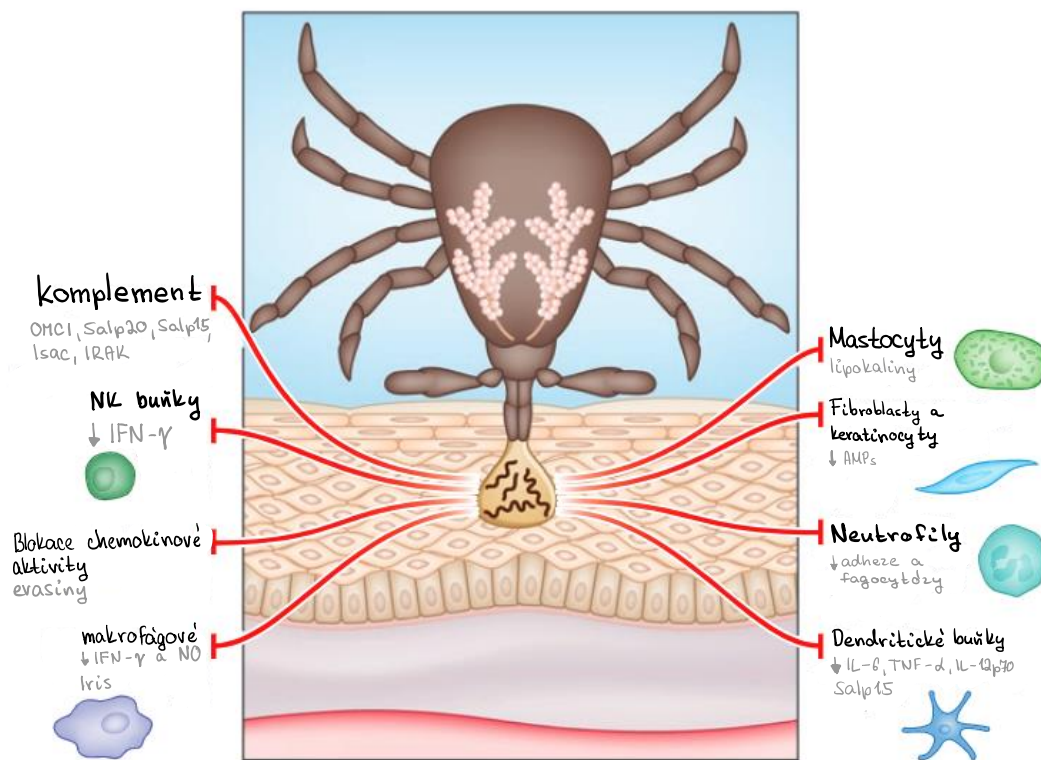
regulátor komplementu – properdin, jehož funkcí je stabilizace C3 konvertázy (Couvreur et al. 2008). Klíšťata *O. moubata* zabraňují produkci C5a redukcí štěpení složky C5 klasickou i alternativní cestou. Molekula OmCl je prvním proteinem z rodiny lipokalinů, která dokáže inhibovat komplement a zároveň jedinou molekulou specificky štěpící C5 komponentu, nikoliv C5 konvertázu C4bC3bC2a. Dokáže tak inhibovat komplement i v pozdní fázi aktivace (Nunn et al. 2005). Sliny klíštěte *I. dammini* inhibují C3b ukládání a podporují uvolňování anafylatoxinu C3a, který má vazoaktivní a chemotaktické vlastnosti (Riberio et al. 1987). Potlačení komplementu hraje esenciální roli v umožnění snadnějšího přenosu patogenů z klíštěte na hostitele.

Součástí zánětu je společně s komplementem i histamin, který je obsažen zejména v granulích žírných buněk a bazofilů. Ty uvolňují obsah svých granul v reakci na různé stimuly poškození. Uvolněný histamin se váže na receptory H1 a H2 na povrchu cévních buněk. Vazba histaminu na receptory způsobuje zvýšení permeability a vazodilataci malých kapilár, čímž umožňuje vstup reparačních molekul do poškozené tkáně v místě klíštěcího kousnutí (Falus 1992). Klíšťata rodu *R. appendiculatus* ve svých slinách obsahují histamin vazebné proteiny HBPs vážící histamin, čímž blokují jeho vazbu na receptory histaminu H1 a H2. HBPs patří do rodiny lipokalinů. Vykazují podobnost nejen s nitroporiny obsaženými ve slinách krevsajcího hmyzu, ale dle cDNA sekvenace také s moubatinem – inhibitorem kolagenem indukované agregace destiček u klíšťat rodu *Ornithodoros moubata* (Keller et al. 1993). Kromě histaminu mohou lipokaliny z klíšťat vázat i serotonin (Sangamnatdej et al. 2002). Mediátorem zánětu je také bradykinin, který je inhibován kininázami klíštěcích slin (Riberio and Mather 1998).

Spojnicí mezi přirozenou a adaptivní imunitou jsou dendritické buňky. Sliny klíštěte *R. sanguineus* inhibují diferenciaci dendritických buněk (Cavassani et al. 2005), zároveň narušují maturaci DC stimulovanou lipopolysacharidy, což vede ke zvýšené produkci IL-10 a redukcii syntézy IL-12 a TNF- α (Oliveira et al. 2010). Prostaglandin E2 ze slin klíštěte *I. scapularis* inhibuje produkci IL-12 a TNF- α dendritickými buňkami kostní dřeně, stejně jako expresi kostimulačního proteinu CD40 (Sá-Nunes et al. 2007). Ve slinách klíštěte *R. appendiculatus* se vyskytuje protein Japanin patřící do skupiny lipokalinů. Japanin inhibuje expresi kostimulačních a koinhibičních transmembránových molekul. Zároveň dochází k potlačení diferenciaci dendritických buněk monocytárního původu (Preston et al. 2013).

Cytokiny a chemokiny jsou molekuly ovlivňující téměř všechny biologické procesy od vývoje embrya přes změny kognitivních funkcí až po stárnutí (Dinarello 2007). Cytokiny slouží ke komunikaci mezi složkami IS. Mezi cytokiny patří rodiny interleukinů, interferonů, MGFs (mesenchymal growth factors), TNFs (tumor necrosis factors), chemokinů a adipokinů (Dinarello 2007). Chemokiny jsou chemoatraktanty interagující s chemokinovými receptory exprimovanými na široké škále imunitních buněk. Klíčící modulace chemokinů, adhezních molekul a prozánětlivých cytokinů je efektivním nástrojem potlačení imunitní odpovědi hostitele (Campbell et al. 1999). TNF- α je prozánětlivý cytokin inhibovaný molekulami slin *Dermacentor andersoni*, *Ixodes ricinus*, *Ixodes scapularis* a *Hyalomma asiaticum asiaticum* (Hovius et al. 2008, Pechová et al. 2004, Wu et al. 2010). Sliny *D. andersoni* také potlačují prozánětlivé cytokiny IL-1 a IFN- γ společně se zvýšením produkce IL-10 (Wu et al. 2010). Tím se snižuje produkce cytokinů Th1 buněk, exprese MHC II molekul a makrofágových kostimulačních molekul (Pestka et al. 2004). Protein IRIS ze slin klíštěte *Ixodes ricinus* interaguje s mononukleárními buňkami periferní krve, váže monocyty a makrofágy a inhibuje jejich schopnost sekretovat TNF- α (Prevot et al. 2009). Sliny klíštěte *A. variegatum*, *R. appendiculatus* a *R. sanguineus* inhibují chemokin CCL3, který funguje jako atraktant neutrofilů, monocytů, eozinofilů, bazofilů, T-lymfocytů a NK buněk (Vancová et al. 2007, Deruaz et al. 2008). Dalšími blokovanými chemokiny jsou chemoatraktanty neutrofilů, monocytů, NK buněk, bazofilů, eozinofilů a dalších buněk IS (Oliveira et al. 2008).

Vazba molekul klíčících slin inhibuje TGF- β , PDGF a FGF, čímž snižují rychlost reparace tkáně hostitele. Společně s potlačením angiogeneze snižují tyto mechanismy pravděpodobnost rezistence hostitele. Klíště brání vstupu leukocytů z oběhového systému do poškozené tkáně a zároveň zabraňuje APC buňkám vstup do oběhového systému, a tím prezentaci antigenů v lymfatických uzlinách (Wikel et al. 2013). Sliny klíštěte *I. ricinus* inhibují produkci superoxidu a oxidu dusnatého aktivovanými makrofágy, zároveň snižují fagocytózu a redukují produkci IFN- γ a TNF (Kuthejlová et al. 2001). Podobný efekt mají sliny *I. scapularis* (Chen et al. 2012).



Obrázek 5: Potlačení přirozené imunitní odpovědi slinami klíštěte v pokožce (převzato a upraveno z Hovius 2009).

Adaptivní imunita je klíšťaty modifikována přímou interakcí slin s B a T-lymfocyty, změnami prezentace antigenu APC buňkami nebo rozpustnými mediátory ovlivňujícími imunitní odpověď (Kazimírová a Štibrániová 2013, Steen et al. 2006). Často pozorovaným jevem je potlačení sekrece Th1 cytokinů IL-2 a IFN- γ a zvýšení sekrece Th2 cytokinů IL-4, IL-5, IL-6 a IL-10 (Schoeler and Wikel 2001). IL-2 působí nejen jako autokrinní faktor při aktivaci T-buněk, ale také jako parakrinní růstový faktor a signální molekula aktivovaným T-buňkám a ostatním efektorovým buňkám imunitního systému, které exprimují receptor pro IL-2 na svém povrchu – B-buňky, NK buňky, CTLs, monocyty a makrofágy (Smith 1992). Ve slinách *Ixodes ricinus* se vyskytuje protein IRIS modulující T-lymfocytární a makrofágovou reaktivitu indukci Th2 cytokinového profilu (Leboulle et al. 2002). Ve slinách klíštěte *I. scapularis* se nachází protein Salp15, který se specificky váže na T-buněčný koreceptor CD4, což vede k potlačení CD4+ buněčné aktivace (Juncadella a Anguita 2009). Cystatin sialostatin L reaguje protizánětlivě a inhibuje proliferaci cytotoxických T lymfocytů (Kotsyfakis 2006). Sliny klíštěte *D. andersoni* obsahují 36kDa velký protein inhibující proliferaci T-lymfocytů (Bergman et al. 2000).

3.4 Patogeny a jejich přenos

Protektivní funkce klíštěcích slin zajišťuje klíšťatům úspěch jako druhu, zároveň však umožňuje transmisi široké škály patogenů do hostitele pomocí změn imunologického mikroprostředí v místě sání a v lymfatické uzlině drénující místo sání (Gillespie et al. 2001). Imunologicky modifikované prostředí je ideální pro přenos a šíření klíšťaty přenosných patogenů. Molekuly klíštěcích slin podporují přenos a šíření Thogotoviru mezi klíšťaty společně se krmíci na jednom hostiteli, přičemž hostitel se může a nemusí virem nakazit (Jones et al. 1989). Sliny klíštěte *R. appendiculatus* podporují přenos parazita *Theileria parva* způsobujícího theileriózu u dobytka (Shaw et al. 1993). Sliny klíštěte *I. ricinus* usnadňují šíření viru klíšťové encefalitidy a gram-negativní bakterie *Francisella tularensis* způsobující tularémii zejména u zajíců a polních hlodavců. Tularémie je ovšem přenosná i na člověka (Labuda et al. 1993). Klíště *D. reticulatus* usnadňuje přenos viru vezikulární stomatitidy u dobytka. Molekuly klíštěcích slin mohou podporovat replikaci viru potlačením aktivity IFN (Hajnická et al. 2000). Sliny klíšťat *I. ricinus* a *I. scapularis* usnadňují přenos a šíření gram-negativní bakterie *Borrelia burgdorferi* způsobující Lymeskou boreliózu (Zeidner et al. 2002, Macháčková et al. 2006). Epidemiologicky největší význam mají TBE virus způsobující klíšťovou encefalitidu a Lymeská borelióza. Klíště se může nakazit krví nemocného hostitele nebo při krmení více klíšťat, z nichž alespoň jedno je nakažené, na jednom hostiteli. Při takovém přenosu se onemocnění nemusí u hostitele rozvinout (Jones et al. 1989, Labuda et al. 1993). Ve střevech klíštěte borelie čekají na další krmení, kdy jsou společně se slinami klíštěte vyloučeny do těla hostitele. Sloučeniny klíštěcích slin efektivně snižují množství zánětlivých infiltrátů v místě kousnutí mnoha mechanismy. Redukce celulární komponenty imunitní odpovědi přirozeně vede ke snížení schopnosti dendritických buněk a dalších APC úspěšně prezentovat antigeny patogena buňkám adaptivní imunity (Slamova et al. 2011). Imunitní odpověď proti *Borrelia burgdorferi* je snížena inhibicí proliferace B-lymfocytů slinami klíšťat *I. ricinus* (Hannier et al. 2003). Ochrana spirochet *Borrelia burgdorferi* před protilátkami je dále umocněna proteinem Salp15 klíštěte *I. scapularis* a jeho homologem ve slinách *I. ricinus* (Hovius et al. 2008). Přenos spirochet Lymeské boreliózy je usnadněn inhibicí alternativní cesty aktivace komplementu slinami *I. scapularis* a *I. ricinus* (Tyson et al. 2007). Inhibice lektinové cesty aktivace komplementu TSLPI (tick salivary lectin pathway inhibitor) ze slin *I.*

scapularis vyvolává sníženou schopnost fagocytózy neutrofilů a pokles lýzy borelií komplemtem (Schuijt et al. 2011). K vývoji onemocnění Lymeskou boreliózou přispívá fakt, že *Borrelia burgdorferi* sama o sobě dokáže modifikovat přirozenou imunitu hostitele, včetně aktivace komplementu (Singh a Girschick 2004). *Borrelia burgdorferi* váže na svém povrchu regulační proteiny komplementu, faktor H a faktor H-like protein 1 inhibující C3konvertázu (Hellwage et al. 2001).

3.4.1 Slinami asistovaný přenos (SAT)

Patogeny využívají slinami způsobenou modulaci obranného systému hostitele a zvyšují tak svoji transmissi a infekčnost. Klíšťaty přenosné patogeny jsou předávány na hostitele ve slinách parazita. Potlačení hemostáze a imunitní odpovědi hostitele slinami klíštěte tento přenos usnadňuje (Nuttall 2019). Některé patogeny využívají slinami asistovaný přenos (SAT) přes tělo hostitele z infikovaného klíštěte na neinfikované dospělé či nymfy bez rozvinutí onemocnění u hostitele. Klíšťata také mohou být schopná přenášet patogeny transmisí přes exozomy – extracelulární váčky v klíštěcích slinách (Hackenberg a Kotsyfakis, 2018). Krmící se klíšťata se často sdružují poblíž sebe na hostiteli, což jim umožňuje nejen sdílení individuálního molekulového složení slin, ale také přenos patogenů (Nuttall 2018). Sliny krevsajících parazitů slouží nejen jako přenosné médium, ale navíc ovlivňují úspěšnost transmise virů, bakterií a prvoků mezi klíšťaty (Fontaine et al. 2011). Slinami asistovaný přenos byl pozorovaný u sympatrických, parasympatrických i alopatrických druhů klíšťat (*I. ricinus*, *I. persulcatus*, *I. scapularis*) (Eisen et al. 2016).

Jedním z nejdůležitějších virů přenášených klíšťaty je TBE virus patřící do čeledi Flaviviridae (Ecker et al. 1999). V roce 1993 zveřejnili Labuda et al. studii, ve které nechali sát klíšťata infikovaná TBE virem s neinfikovanými nymfami na přirozených hostitelích těchto klíšťat. Hostitelé (myš, hraboš, ježek, bažant) nejevili známky předchozí expozice TBE viru (Labuda et al. 1993). Tato studie zprostředkovala první důkazy o transmissi TBE viru z infikovaného klíštěte na neinfikované v průběhu sání na přirozeném hostiteli nezávisle na vývoji virémie u hostitele (Labuda et al. 1993). Přežití TBE viru odhadované na základě reprodukčního čísla ukazuje na skutečnost, že vir nemůže v přírodě přežít bez transmise přes nenakaženého hostitele (Hartemink et al., 2008). Tento způsob přenosu TBE viru mezi klíšťaty je usnadněn sdružováním klíšťat na jednom místě na hostiteli v průběhu sání a také faktory ve

slinách klíšťat. Slinné žlázy nenakažených klíšťat působí jako adjuvant, tj. zvyšují pravděpodobnost přenosu viru z infikovaného klíštěte (Alekseev et al., 1991). Faktory slinami asistované transmise usnadňující přenos patogenů jsou zatím předmětem studií. SAT faktory zvyšující přenos *Thogotoviru* klíštětem *R. appendiculatus* jsou pravděpodobně bílkovinné povahy, jelikož jejich aktivita byla po použití proteáz utlumena (Jones et al. 1990).

Alespoň dva SAT faktory byly identifikovány pro patogeny přenášené mezi komáry. Protein CLIPA3 ze slin *Aedes aegypti* zvyšuje replikaci a diseminaci viru horečky dengue *in vitro* proteolýzou proteinů extracelulární matrix, čímž zvyšuje invazi virů a vyvolává buněčnou migraci (Conway et al. 2013). Podobně působí 15 kD velký protein LTRIN ze slin *Aedes aegypti*, který zvyšuje patogenitu viru Zika narušením signálních drah přes lymfotoxin β receptor – LT β R (Jin et al. 2018).

Stejně jako v případě TBE viru i *Borrelia burgdorferi* je efektivně přenášena z infikovaných klíšťat na neinfikovaná klíšťata prostřednictvím hostitele, který se nemusí nakazit (Gern a Rais 1996). Sliny klíštěte nebo extrakt ze slinných žláz umocňují přenos spirochet borélií na hostitele a mezi přísátými klíšťaty. Prvním identifikovaným SAT faktorem klíštěčích slin byl protein Salp15, prvotně objevený jako imunomodulační molekula ve slinách *I. scapularis* (Anguita et al. 2002). Salp15 se váže na CD4 koreceptor savčích T buněk, čímž inhibuje buněčné signální dráhy. To má za následek potlačení imunity specificky pro CD4 T buňky. Salp15 dále váže C-lektinové receptory (CLR), inhibuje Toll-like receptorovou indukci prozánětlivých cytokinů a T-buněčnou aktivaci vyvolanou dendritickými buňkami (Nuttall 2019). Salp15 se váže na OspC protein na povrchu *B. burgdorferi* a chrání spirochety před účinkem hostitelských protilátek, což zvyšuje pravděpodobnost nákazy hostitele a dalších klíšťat (Dai et al. 2009). Experimenty provedené na klíšťatech *I. scapularis* s knockdownem genu pro Salp15 přinesly důkazy o zvýšení transmise spirochet borélií v přítomnosti proteinu Salp15 (Dai et al. 2009). Homology proteinu Salp15 byly nalezeny ve všech klíšťatech přenášejících boreliózu. Jeden z homologů objevený ve slinách *I. ricinus*, protein Salp15-Iric-1 sdílí 82% homologie se Salp15 a je vysoce exprimován v prvních třech dnech sání (Hovius et al. 2007). Iric-1 se stejně jako Salp15 váže na OspC na povrchu *B. burgdorferi*, čímž zvyšuje ochranu spirochet před obranným systémem hostitele. Slinami asistovaný přenos spirochet je účinný proti klasické a alternativní cestě aktivace komplementu. Lektinová cesta se aktivuje, pokud se pattern recognition molekuly (PRM) – fikoliny a kolektiny naváží na glykosylované struktury na povrchu patogenů (Kjaer et al. 2015). Ve slinách klíštěte *I. scapularis* se nachází

8 kD velký inhibitor lektinové cesty aktivace komplementu (TSLPI) (Schuijt et al. 2011). TSLPI jako faktor slinami asistovaného přenosu pomáhá patogenům inhibicí lektinové cesty aktivace komplementu, což má za následek snížení komplementem indukované lýzy (Schuijt et al. 2011). Homology TSLPI byly identifikovány ve slinách mnoha dalších druhů rodu *Ixodes*. Protein ze slin *I. ricinus* inhibuje *in vitro* lektinovou cestu aktivace komplementu a chrání tak *B. burgdorferi s. s.* a *B. garinii* před komplementem zprostředkovanou lýzou. Dalšími proteiny chránícími spirochety borélií jsou proteiny ISAC a Salp20 (Tyson et al. 2007). Ke zvýšení přenosu nepřímo přispívá histamin uvolňující faktor tHRF ze slin *I. scapularis*, který umožňuje klíštěti pozdní rychlou fázi nasátí. Rápidní zvýšení objemu nasáté krve v krátkém čase podporuje přenos *B. burgdorferi* (Dai et al. 2010). Faktor SAT ze slin *I. ricinus* je 18 kD velký inhibitor B buněk, který tlumí B buněčnou proliferaci aktivovanou proteiny OspA a OspC na povrchu *B. burgdorferi* (Hannier et al. 2004). Fenomén SAT byl prokázán i u flaviviru Powassan (Hernance a Thangamani 2015).

3.5 Získaná rezistence vůči klíšťatům

U některých druhů zvířat byla po druhém nebo dalším napadení klíštětem pozorována získaná imunitní rezistence (Wikel 1996). ATR (acquired tick resistance) se projevuje redukcí nasátí krmících se klíšťat, snížením počtu přichycených klíšťat, zkrácenou dobou krmení a redukcí produkce vajíček nebo jejich životaschopnosti (Karasuyama et al. 2020). Vývoj ATR není omezen pouze na napadenou tkáň, jedná se o komplexní systémovou odpověď hostitele. Z klinického hlediska je vývoj imunitní rezistence důležitý zejména díky snížení transmise patogenů u hostitele s vyvinutou ATR (Nazario et al. 1998).

Při prvním napadení klíštětem jsou antigeny klíštěcích slin pohlcovány dendritickými buňkami, které putují do lymfatických uzlin a prezentují antigeny T buňkám. T buňky po setkání se správným antigenem pomáhají při aktivaci folikulárních B buněk. B-buňky produkují specifické IgE protilátky, které se váží na FcεRI receptory na povrchu bazofilů a mastocytů. Bazofily jsou nejméně zastoupeným typem granulocytů. Cirkulují v periferní krvi a infiltrují do tkáně, ve které se objeví zánět (Galli 2000, Stone et al. 2010). Bazofily sdílejí s tkáňovými mastocyty expresi vysoce afinního IgE receptoru FcεRI na buněčném povrchu, dále pak vypouštění proalergických mediátorů, zejména histaminu v odpovědi na různé stimuly (Stone et al. 2010). Část aktivovaných CD4+ T-lymfocytů je distribuována do

pokožky, kde se z nich stávají tkáňové paměťové T-lymfocyty. Při dalším napadení klíštětem jsou tyto paměťové T-buňky aktivované antigeny klíštěčích slin, což vede k produkci IL-3, který přivádí bazofily do místa poškození tkáně (Ohta et al. 2017). IL-3 komplex (IL-3 + anti-IL-3 protilátka, která funguje jako nosič cytokinu a prodlužuje poločas v hostiteli) usnadňuje diferenciaci progenitoru granulocytů a monocytů do progenitoru bazofilní linie, ne však do eosinofilní linie ani mastocytů v kostní dřeni. Lokální produkce IL-3 aktivovanými paměťovými T-lymfocyty vede k selektivní podpoře bazofilní aktivace, adheze k endotelu a infiltraci do extravaskulárního místa zánětu (Bochner et al. 1990). Výskyt bazofilů je esenciální pro rozvoj ATR. Studie provedená na myších dále ukázala, že myši deficientní na mastocyty nedokážou rozvinout získanou rezistenci vůči klíšťatům (Matsuda et al. 1985). Dalšími buňkami vyskytujícími se ve tkáni sekundárně napadené klíštětem jsou monocyty, makrofágy, neutrofilů a eozinofily (Wada et al. 2010). Při pokusech na morčatech se ukázalo, že svou roli při vývoji ATR hraje i komplement fungující jako chemoatraktant bazofilů (Allen et al. 1979). Bazofily, mastocyty a eozinofily jsou klíštěcími antigeny stimulované k vypouštění histaminu z granul. Histamin vyvolává svědění, čímž zvyšuje šanci na odstranění klíštěte (Koudstaal et al. 1978). Histamin také indukuje zánět aktivací mastocytů, eozinofilů, bazofilů a Th2 buněk pomocí histaminového H4 receptoru (Ohsawa et al. 2014). Dále zvyšuje expresi histaminového receptoru H1 u keratinocytů, což vede k vývoji epidermální hyperplazie a tloušťnutí epidermis, čímž se vytváří překážka pro uchycení a úspěšné nasátí klíštěte (Karasuyama et al. 2020).

Vývoj a síla ATR jsou odlišné u přirozených a nepřirozených hostitelů klíštěte. Zatímco u nepřirozeného hostitele se rezistence rozvíjí poměrně rychle, u přirozeného hostitele se ATR nemusí vůbec objevit nebo je potřeba více opakovaných napadení. To může být způsobeno koevolucí klíšťat s jejich přirozenými hostiteli, jejichž interakce může být optimalizována pro úspěšné nasátí klíštěte. K této domněnce přispívá fakt, že klíšťata stejného druhu exprimují rozdílné složení proteinů slin v závislosti na momentálním hostiteli (Narasimhan et al. 2019).

4 Alfa-gal

Oligosacharid $\text{Gal}\alpha 1\text{-3Gal}\beta 1\text{-(3)4GlcNAc-R}$ (α -gal) je produkován všemi savci s výjimkou lidoopů, lidí a úzkonosých opic (Cabezas-Cruz et al. 2018). Vyjmenované skupiny ztratily možnost syntetizovat α -gal, následkem čehož jsou schopny produkovat velké

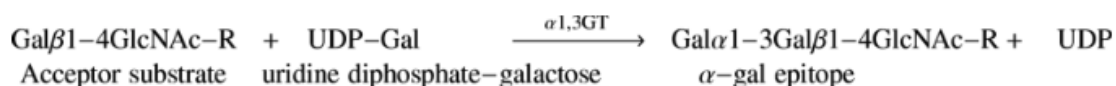
množství protilátek proti tomuto sacharidu. Anti-Gal je přirozeně se vyskytující protilátka tvořící až 1 % lidských imunoglobulinů, čímž α -gal epitop získává klinický význam. Anti-Gal rozpoznává sacharidový epitop Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R (α -gal epitop). Anti- α -gal protilátky představují významnou imunologickou bariéru v xenotransplantaci vedoucí k odmítání prasečích orgánů u opic a lidí (Macher a Galili 2008), přičemž tato bariéra byla v nedávné době překročena vývojem prasat s KO α 1,3GT – enzymu katalyzujícím syntézu α -gal epitopu. U lidí jsou anti- α -gal IgE protilátky také asociovány s výskytem α -gal syndromu (alergie na červené maso a některá farmaka) (Cabezas-Cruz et al. 2018). Unikátní anti-Gal/ α -gal epitop interakce má klinický význam pro zvýšení účinnosti virových a mikrobiálních vakcín a v imunoterapii proti rakovině (Macher a Galili 2008). IgG a IgM protilátky mohou být součástí evoluční ochrany proti patogenům obsahujících α -gal na svém povrchu (Cabezas-Cruz et al. 2018). Anti-Gal se také vyskytuje v podobě IgA protilátek v tělních sekretech (Galili 1993).

4.1 Výskyt α -gal epitopu a jeho syntéza

α -gal epitop se přirozeně vyskytuje v glykokonjugátech vačnatců a placentárních savců s výjimkou lidoopů, lidí a úzkonosých opic. U ostatních obratlovců – ryb, obojživelníků, plazů a ptáků se α -gal epitop taktéž nevyskytuje. α -gal epitop byl také nalezen u některých primátů, zejména pak lemurů a ploskonosých opic (Galili et al. 1987). Prvním nalezeným glykolipidem s α -gal epitopem byl ceramid pentahexosid králičích erytrocytů a retikulocytů. S objevem přirozeně se vyskytujících anti-Gal lidských protilátek byly vytvořeny myší monoklonální protilátky Gal-13. Gal-13 se váží na terminální sekvenci Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R glykokonjugátů, čímž vznikl nástroj pro snazší identifikaci distribuce glykokonjugátů s α -gal epitopem napříč druhy (Galili et al. 1987). Glykolipidy s α -gal epitopem byly s použitím Gal-13 monoklonálních protilátek nalezeny v ledvinách ovcí, prasat, králíků a krav (Hendricks et al. 1990). Dalším místem výskytu glykolipidů s α -gal epitopem je brzlík ovcí, prasat a králíků (He et al. 1993). Pomocí NMR (nukleární magnetická rezonance) byla charakterizována struktura tyroglobulinu mnoha savců obsahující Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R terminální konec (Spiro et al. 1984, Dorland et al. 1984). Pomocí RIA (radioimmunoassay) byly objeveny další glykoproteiny s α -gal epitopem u ploskonosých opic a savců s výjimkou primátů. Jsou jimi

laminin, fibrinogen a imunoglobulin G, které obsahují proměnlivý počet epitopů α -gal (Thall a Galili 1990).

Syntéza α -gal epitopu je katalyzována enzymem 3Gal β 1-4GlcNAc α 1-3galaktosyltransferázou (α 1,3GT). α 1,3GT využívá donoru UDP-Gal a buď glykosfingolipidu nebo glykoproteinu nesoucího Gal β 1-4GlcNAc-R nebo Gal β 1-3GlcNAc-R akceptorový substrát a katalyzuje následující reakci:



Distribuce exprese α -gal epitopu na buněčném povrchu nebo v glykokonjugátech je paralelní s distribucí α 1,3GT aktivity (Galili et al. 1988). α 1,3GT je membránový vazebný protein s délkou ~270 aminokyselin. Je to globulární protein s centrálním β -sheetem a elementy se strukturou α -helixu (Gastinel et al. 2001). Glykosyltransferázy jsou rodinou proteinů sdílejících jen malou aminokyselinovou homologii. Mezi druhy se protein liší v N-terminálním regionu mezi 1-99 AK, prvních ~90 AK není nezbytných pro funkci proteinu. Jiné úpravy mají na funkci vliv, proto obecně GT vykazují velkou míru homologie (~90 %) mezi 100 AK a C-koncem. C – terminální segment zaujímá vysoce strukturní konformaci a je nezbytný pro katalytickou funkci enzymu. Všechny galaktosyltransferázy sdílejí krátkou transmembránovou doménu, která tvoří kotvu glykosyltransferázy v Golgiho aparátu (GA), proteinovou doménu tvořenou krátkým cytoplazmatickým úsekem a kmenovou doménu, která vyštípnutím slouží pro vypuštění rozpustného, katalyticky aktivního fragmentu lokalizovaného v lumen GA (Macher a Galili 2008). Houby a bakterie sdílejí expresi genů kódujících enzym α 1,3GT, ale prokaryotické a eukaryotické α 1,3GT proteiny sdílejí jen malou strukturní homologii (Jennings et al. 1998, Chen et al. 2016). Rozdílnost α 1,3GT enzymů prokaryot a eukaryot poukazuje na nezávislý vývoj těchto enzymů a distribuce glykanů s α -gal epitopem evolučními liniemi tak hraje důležitou roli v interakci patogenů s hostiteli (Bishop et al. 2007).

4.1.1 α -gal u klíšťat

I. scapularis má v genomu domnělých 57 *galt* genů patřících do tří galaktosyltransferázových rodin, a to GT7, GT31 a GT32 (Lombard et al. 2013). V bakteriích a savcích se vyskytují α 1-3GALT z rodiny GT6. Klíštěcí GALT proteiny kódované geny *b4galt7*, *a4galt-1* a *a4galt-2* syntetizují α -gal nebo jsou součástí cesty syntézy α -galu. Syntéza α -galu těmito geny je vyšší u nakrmených klíšťat v porovnání s nenakrmenými. Zároveň se při krmení zvyšuje hladina genů *b4galt7*, *a4galt-1* a *a4galt-2* ve střevech, genů *b4galt7* a *a4galt-1* ve slinných žlázách a genu *a4galt-1* v ovariích (Caberaz-Cruz et al. 2018). Knockout (KO) všech tří genů vede ke zvýšené mortalitě klíšťat v prvních třech dnech krmení (Caberaz-Cruz et al. 2018). Mortalita klíšťat s KO geny může znamenat nezbytnost α -galu pro úspěšné krmení klíšťat nebo klíštěcí napodobování glykanů obratlovců za účelem vyhnutí se imunologické detekci. V obou případech vede ke snížení úspěšnosti krmení a tím narušení životního cyklu klíšťat, což dokazuje důležitost těchto genů. α -gal se do klíšťat může dostat také ze zbytků glykoproteinů nebo glykolipidů obsahujících α -gal, které klíště nasaje společně s krví savců. Pravděpodobnější je ovšem cílená exprese α -galu klíštěcími buňkami, mimo jiné jako obrana proti patogenům (Steinke et al. 2015). Geny *a4galt-1* a *a4galt-1/2* zvyšují svou expresi ve střevě klíštěte při infekci *A. phagocytophilum*, což může být způsobeno expresí proteinů, jejichž součástí je α -gal. Homology takových proteinů byly identifikovány i u *I. scapularis* v odpovědi na napadení *A. phagocytophilum* (Caberaz-Cruz et al. 2018). Proteiny, jejichž součástí je α -gal epitop, byly nalezeny také u klíšťat *R. bursa*, *H. marginatum*, *I. ricinus*, *A. sculptum* a *H. longicornis*.

4.2 Inaktivace α 1,3GT

Lidé mají ve svém genomu homologní pseudogen na chromozomu 9 se stejnou exon/ intron organizací jako α 1,3GT u myši (Joziase et al. 1991). Dvě bodové mutace (delece) v nejdelším exonu 9 způsobují posun čtecího rámce a předčasný výskyt stop kodónu, což vede k inaktivaci α 1,3GT (Galili a Swanson 1991). Další mutace byly nalezeny v exonu 7 a 8, což poukazuje na fakt, že inaktivace α 1,3GT je způsobena změnou struktury přepisovaného genu vedoucí k produkci nefunkčního proteinu. Další pseudogen α 1,3GT bez intronů s četnými delecemi byl nalezen na chromozomu 12 (Joziase et al. 1991).

Funkce α -gal epitopu zatím není známá. V některých druzích může mít α -gal epitop biologickou roli, zejména pak v interakci buňka-buňka a buňka-matrix. Konzervace exprese α -gal epitopu u lemurů a ploskonosých opic je způsobena geografickou bariérou, která mezi nimi vznikla oddělením jižní Ameriky od Afriky před 35 miliony let (výskyt ploskonosých opic) a oddělením Madagaskaru před 60 miliony let (výskyt lemurů). Inaktivace α 1,3GT se objevuje společně s výskytem geografické bariéry pravděpodobně z důvodu vysokého selekčního tlaku omezeného na kontinent starého světa (Afriky) (Galili 1993). Selekční tlak je asociován s výskytem infekčního agens, který sužoval opice starého světa před cca 28 miliony let a byl endemický pro Afriku. Tento vir, bakterie nebo prvok exprimovaly na svém povrchu α -gal epitop nebo jiný, strukturně podobný sacharid vyvolávající imunologickou reakci obdobnou α -galu (Macher a Galili 2008). Inaktivace α 1,3GT genu vedla k potlačení α -gal exprese úzkonosých primátů, která eliminovala imunitní toleranci α -gal epitopu. Tím byla umožněna produkce anti-Gal protilátek jako obrana proti danému agens. Tato domněnka je podpořena několika pozorováními: i) obalené viry množící se v buňce s aktivní α 1,3GT exprimují α -gal epitop na svých glykoproteinech, zatímco viry s životním cyklem v buňkách s inaktivní α 1,3GT α -gal epitop postrádají (Repik et al. 1994), ii) bakterie a protozoa exprimují sacharidové epitopy schopné vázat anti-Gal (Galili et al. 1988) a iii) anti-Gal má schopnost ničit viry a prvoky exprimující α -gal epitop (Welsh et al. 1998). Alternativní příčinou ztráty α 1,3GT aktivity mohlo být použití α -gal epitopu jako buněčného receptoru patogenem. Ukázkou takové aktivity je enterotoxin A grampozitivní bakterie *Clostridium difficile*, jehož primárním ligandem je α -gal epitop střevních buněk (Krivan et al. 1986). Endemická infekce opic starého světa by vytvořila pozitivní selekční tlak na jedince potlačující expresi α -gal epitopu. To by vedlo ke ztrátě imunologické tolerance vůči α -gal epitopu, čímž se přirozeně začne produkovat anti-Gal v odpovědi na antigenní stimulaci gastrointestinálními bakteriemi exprimujícími podobné sacharidové epitopy – taková antigenní stimulace probíhá v lidské intestinální flóře dodnes (Galili et al. 1988).

5 Konflikt

V důsledku inaktivace α 1,3GT trpí lidé obtížemi spojenými s protilátkami proti α -gal epitopu. Mimo klíšťaty přenosná onemocnění se mohou u některých jedinců objevit opakované anafylaktické reakce po požití červeného masa nebo při léčbě rakoviny monoklonálními protilátkami.

Většina pacientů se zvýšeným množstvím IgE protilátek byla dříve vystavena klíštěcímu kousnutí. Klíštěcí kousnutí stimuluje B buňky k produkci IgE protilátek proti α -gal epitopu dvěma způsoby – přes antigen prezentující buňky v kontextu Th₂ buněčné složky imunitní odpovědi a stimulací již existujících anti- α -Gal IgG a IgM produkujících B-buněk prostaglandiny E₂ klíštěcích slin (Caberaz-Cruz et al. 2019). Anti- α -Gal protilátky komplikují léčbu rakoviny cetuximabem, jehož molekula obsahuje dva α -gal epitopy. Vazba protilátek na α -gal epitopy vede k vypouštění mediátorů hypersenzitivity zahrnujících histamin, prostaglandiny, tryptázy a cytokiny (Khan a Kemp 2011). Lehčími projevy hypersenzitivní reakce jsou začervenání, kopřivka, zvýšená teplota a vyrážka. U těžších případů nastupuje dušnost, otoky a anafylaktický šok. Reakce na cetuximab obvykle začne v řádu minut po zahájení léčby. Pacienti s projevy hypersenzitivní reakce musí léčbu přerušit. Řešením pro takové pacienty je záměna cetuximabu za čistě lidskou monoklonální anti-EGFR IgG2 protilátku panitumumab (O’Neil et al. 2007). Podobná reakce vytváří problémy při xenotransplantacích. Na každé prasečí buňce se nachází množství α -gal epitopů. Vazba lidských anti- α -Gal protilátek na α -gal epitopy spouští kaskádu dějů způsobujících kolaps krevního zásobení transplantátu, ischemii a rapidní odmítání (Galili 1993). Dnešní technologie genové manipulace donorových prasat dokáží zvýšit imunologickou toleranci recipientů. Anti- α -Gal protilátky v neposlední řadě způsobují u některých lidí alergii na červené maso, tzv. α -gal syndrom. Tato alergie je asociována s IgE protilátkami proti α -gal epitopu. Klinicky se projevuje podobně jiným potravinovým alergiím – dušnost, vyrážka, začervenání, otok, horečka až anafylaktický šok. Odlišuje se pozdním nástupem. První příznaky se mohou objevit až 8 hodin po požití alergenu, což komplikuje určení správné diagnózy.

5.1 Cetuximab

U většiny epiteliálních nádorů je abnormálně aktivován receptor tyrozin kinázy EGFR (epidermal growth factor receptor). EGFR patří do rodiny ErbB a v nádorových buňkách

dochází buď k jeho zvýšené expresi nebo k abnormální aktivaci. Exprese EGFR vede ke spuštění signální dráhy Ras-Raf-mitogen-activated-protein-kinase (MAPK), která indukuje transkripci molekul souvisejících s buněčnou proliferací a transformací. Dalšími signálními drahami jsou fosfatidylinositol-3-kináza a protein-serine/threonin kináza, která spouští kaskádu odpovědí vedoucích k buněčné proliferaci, růstu, zvýšení životnosti a motility buněk (Schlessinger 2000). Dvě třídy anti-EGFR molekul – monoklonální protilátky a inhibitory tyrozin kinázy s nízkou molekulovou hmotností, měly protinádorovou aktivitu. Monoklonální protilátky (Cetuximab) cílí na ligand vážící extracelulární doménu a zabraňují tak vazbě ligandu. Inhibitory tyrozin kinázy soutěží s ATP o vazbu na tyrozin kinázovou část receptoru (Matar et al. 2004).

Cetuximab je chimérická myší/ lidská IgG1 monoklonální protilátka proti receptoru epidermálního růstového faktoru schválená pro léčbu metastazujících rakovinných nádorů hlavy, krku, tlustého střeva a konečníku (Blick a Scott, 2007). Cetuximab se s vysokou afinitou váže na Fc γ RI a Fc γ RIIIa receptory a efektivně navozuje na protilátkách závislou buněčnou cytotoxicitu (ADCC) pro nádorové buňky (Patel et al. 2010). Jeho aktivita je závislá na protilátkové glykosylaci, IgG1 izotypu a expresi EGFR na cílové buňce. Bylo prokázáno, že se cetuximab váže na nádorové buňky a je schopný aktivovat NK buňky, eozinofily a neutrofilů proti označeným nádorovým buňkám (Patel et al. 2010). V roce 2004 byl schválen jako lék proti rakovině tlustého střeva. V roce 2006 pak pro léčbu karcinomu krku a hlavy. Od roku 2002 začaly být zaznamenávány případy těžké hypersenzitivity u některých pacientů. V letech 2007-2008 se ukázalo, že hypersenzitivita postihuje zejména obyvatele jihovýchodní části USA, což vedlo k domněnce o přítomnosti dalších faktorů zahrnujících stravu a prostředí, popř. expozici parazitům (O'Neil et al. 2007, Commins et al. 2011). HSR (hypersenzitivní reakce) se projevila až u 22 % pacientů v Tennessee a Severní Karolíně, zatímco u pacientů ze severozápadu USA u méně než 1 % (O'Neil et al. 2007). Hypersenzitivní reakce se u pacientů projevuje v různých stupních závažnosti. Nejčastějšími symptomy jsou začervenání, vyrážka, zvýšená teplota, kopřivka, dušnost, hypotenze a v nejtěžších případech anafylaktický šok (O'Neil et al. 2007). V roce 2008 Chung et al. publikovali práci, ve které odhalili specifitu IgE protilátek vyvolávajících HSR pro oligosacharid galaktóza- α -1,3-galaktózu, která se nachází na Fab fragmentu těžkého řetězce cetuximabu, konkrétně na aminokyselině 88 a 299 (Commins et al. 2014). α -gal oligosacharid je obvykle cílem IgG protilátek, jež se vyskytují v krvi všech imunokompetentních lidí. IgE protilátky se objevují pouze u některých jedinců

(Commins et al. 2014). Chung et al. dále zjistili, že většina pacientů s hypersenzitivitou měla tyto IgE protilátky ještě před zahájením léčby (Chung et al. 2008). V roce 2009 Commins et al. nachází stejné geografické rozdělení pozdní alergické reakce na červené maso u pacientů s IgE protilátkami proti molekule α -galu (Commins et al. 2009).

Reakce na biologické antigeny mohou být klasifikovány jako IgE a non-IgE reakce a mohou se manifestovat v kožní, plicní a srdeční formě (Bircher a Hofmeier 2012). V případě cetuximabu se jedná o IgE zprostředkovanou reakci, kdy IgE protilátky jsou specifické pro α -gal komponentu na Fab fragmentu těžkého řetězce cetuximabu (Chung et al. 2008). Každá molekula cetuximabu obsahuje dva α -gal epitopy, na které se váží anti-Gal IgE protilátky. Fcε receptor mastocytů specificky váže Fc oblast IgE protilátek (Chung et al. 2008). Vazba IgE na FcεRI vede k senzibilizaci mastocytů a po jejich přemostění k degranulaci spojenou s vypouštěním mediátorů hypersenzitivity včetně histaminu, prostaglandinu, leukotrienů, tryptáz a cytokinů (Khan a Kemp 2011). Reakce obvykle nastupuje v řádu minut po zahájení léčby. To je pravděpodobně způsobeno intravaskulárním podáním léku a přítomností galaktóza- α -1,3-galaktózy na obou Fab fragmentech cetuximabu, což umožňuje efektivní cross-linking IgE na mastocytech (Chung et al. 2008). Pacienti s hypersenzitivní reakcí na cetuximab mohou k léčbě využít čistě lidskou monoklonální IgG protilátku panitumumab (O'Neil et al. 2007).

5.2 Alfa-gal syndrom

Alfa-gal syndrom neboli hypersenzitivita na červené maso je nejméně zastoupenou potravinovou alergií (Jacquet et al. 2009). Většina alergií je založena na reakci protilátek proti proteinům, nicméně α -gal syndrom je opožděná reakce na červené savčí maso asociovaná s IgE protilátkami proti oligosacharidu α -gal (Commins a Platts-Mills 2010). Chung et al. v roce 2008 identifikoval IgE protilátky specifické pro α -gal, když studoval alergické reakce pacientů s rakovinou léčených cetuximabem (Chung et al. 2008). Produkci anti- α -gal protilátek v reakci na klíštěcí kousnutí lze vysvětlit dvěma mechanismy. Prvním je prezentace α -gal antigenu klíštěcích slin APC buňkám v kontextu Th₂ buněčné složky imunitní odpovědi vyvolané klíštěcími slinami. Druhý mechanismus vysvětluje produkci IgE protilátek stimulací již existujících anti- α -gal IgG a IgM produkujících B-lymfocytů

prostaglandiny E2 klíštěcích slin, což vede k vývoji B-lymfocytů produkujících IgE protilátky (Caberaz-Cruz et al. 2019). Expozice potravinovým alergenům obsahujícím α -gal má za následek tvorbu IgG, IgM a IgE produkujících B-buněk a tím vývoj imunitní odpovědi. V rizikových skupinách (genetická a environmentální predispozice, např. tučná strava či klíštěcí kousnutí) může α -gal expozice APC vést k aktivaci Th₂ buněk a indukci produkce interleukinů vedoucí k IgE expresi B-buňkami. To vede k akumulaci mastocytů, eozinofilů a bazofilů a k IgE hypersenzitivní reakci (Khan a Kemp 2011). Klinická prezentace α -gal syndromu je podobná jiným potravinovým alergiím s několika unikátními charakteristikami. Lehčí symptomy zahrnují kopřivku, dušnost, nízký krevní tlak a otok. V těžších případech se rozvine anafylaktický šok. Reakce nastupuje až několik hodin po požití alergenu a pacienti před prvními symptomy alergie ve většině případů tolerovali červené maso (Commins et al. 2009). Některé genetické predispozice mohou u jedince vyvolat alergii na červené maso, nicméně klíštěcí kousnutí hraje v rozvoji α -gal alergie velkou roli (Commins et al. 2009). Přítomnost krevní skupiny B snižuje riziko manifestace AGS z důvodu částečné tolerance α -gal epitopu. α -gal epitop má totiž velmi podobnou strukturu jako antigen krevní skupiny B (Caberaz-Cruz et al. 2019). Zvláště vysoký výskyt vývoje alergií byl zaznamenán po kousnutí *Abyomma americanum* vyskytující se na jihovýchodě a středě USA (Commins et al. 2011). Kousnutí *A. americanum* je asociované s výskytem STARI (southern tick-associated rash illness) projevující se lézemi kůže, horečkou, svalovou slabostí a bolestmi kloubů (Masters et al. 2008). Přestože zatím není přímý důkaz vzniku α -gal hypersenzitivity v důsledku klíštěcího kousnutí, existují silné korelace mezi protilátkami proti antigenům klíšťat a anti- α -gal IgE protilátkami. Většina jedinců s vysokou hladinou anti- α -gal IgE protilátek byla dříve vystavena klíštěcími kousnutí (Commins et al. 2011). Při pokusech v Austrálii se ukázalo, že 24/25 pacientů s rozvinutou α -gal alergií bylo dříve vystaveno klíštěcímu kousnutí, pravděpodobně druhem *Ixodes holocyclus* (Van Nunen et al. 2009). Podobně tomu bylo ve Španělsku, kde byli pacienti napadeni klíštětem *I. ricinus* před výskytem zdravotních problémů (Nunez et al. 2011).

První případ anafylaktické reakce následkem klíštěcího kousnutí byl nahlášen v Austrálii v roce 1940 (Mckay 1940). Později byly hlášeny další případy v USA a Evropě (Van Wye et al. 1991). Hypersenzitivní reakce se může projevit jako primární efekt IgE v odpovědi na antigeny klíštěcích slin nebo jako sekundární reakce po konzumaci červeného masa nebo podání některých α -gal epitop obsahujících léčiv (Van Wye et al. 1991, Commins et al. 2011).

Anafylaktický šok v reakci na napadení klíštětem se může o pacientů vyskytovat, aniž by se projevila alergie na červené maso. Ve slinách většiny klíšťat se vyskytují proteiny posttranslačně modifikované připojením α -gal řetězce, které souvisejí s mechanismem pro úspěšné sání klíšťat (Chmelar et al. 2016). Proteiny s α -gal epitopem byly identifikovány u klíšťat *A. americanum*, *I. ricinus*, *H. longicornis*, *R. bursa* a *H. marginatum* (Chinuki et al. 2016, Commins et al. 2011, Hamsten et al. 2013).

Spojitosť mezi AGS a napadením klíšťaty je patrná po celém světě bez ohledu na rozložení druhů klíšťat a populace (Commins et al. 2011). Klíštěcí sliny a extrakt ze slinných žláz (SGE) zvyšují množství IgE protilátek v séru. Všichni pacienti trpící AGS musí být informováni, že další napadení klíštětem může vést k silnějším projevům alergické reakce (Levin et al. 2019). Naopak u většiny (až 89%) pacientů hladina IgE protilátek klesla, pokud se dlouhodobě vyhýbali kontaktu s klíšťaty (Commins et al. 2011). Zhruba u 12 % pacientů to znamená možnost opětovné konzumace červeného masa (Commins 2016). Závažnost alergické reakce a její pozdní nástup neurčuje množství α -gal specifických protilátek v krvi, spíše zkonsumované množství a přítomnost kofaktorů, jakými jsou například alkohol nebo fyzická aktivita (Commins et al. 2014). Stejně jako u jiných potravinových alergií snižuje přítomnost kofaktorů nutné množství alergenu k rozvoji alergické reakce (Brockow et al. 2015). AGS se může rozvinout u dospělých i u dětí. Napadení klíštětem není vždy podmínkou vzniku alergie. Hladina IgE protilátek specifických pro α -gal se přechodně zvyšuje bodnutím včely či vosy (Commins 2020). To je nejspíše způsobeno přítomností alergenu Api m 5. Api m 5 je dipeptidyl peptidáza. V klíštěcích slinách se vyskytuje podobný enzym, což může vysvětlovat nárůst anti-gal IgE protilátek po vosím nebo včelím žihadle (Commins 2020).

Oddálená reakce na červené maso může být způsobená procesem trávení. Lipidové a glykoproteinové komplexy nejspíše zpožďují absorpci a prezentaci α -gal antigenu APC (Commins et al. 2009). Glukóza dosahuje svého maxima obsahu v plazmě již po 2 hodinách, zatímco triacylglyceridy dosahují maxima po 4-5 hodinách. Triacylglyceridy jsou tenkým střechem zabaleny do chylomikronů a VLDLs (very low density lipoproteins), které vstupují nejdříve do lymfatického systému a až poté jsou vyprázdněny do krevního oběhu (Porter et al. 2007). α -gal epitop se hojně vyskytuje v glykolipidech a glykoproteinech savců s výjimkou primátů. Zvláště hojně se nachází v červeném mase – hovězím, vepřovém a jehněčím (Macher a Galili 2008). Glykoproteiny a glykolipidy potřebují být nejdříve stráveny ve střevním lumen, než mohou být pohlceny do krevního oběhu enterocyty. Tyto α -gal obsahující produkty

trávení jsou pravděpodobně rozpustné v tucích a transportované pomocí VLDLs a chylomikronů (Commins et al. 2009). Některé α -gal epitopy jsou vloženy v glykolipidech do fosfolipidové dvojvrstvy a svou orientací vně spouštějí alergické reakce.

Diagnóza AGS se určuje většinou komerčně dostupnými krevními testy pro α -gal specifické IgE nebo intradermálními kožními testy (Commins et al. 2009). Kožní prick testy se ukázaly být nespolehlivé. Hladina protilátek pro potvrzení diagnózy AGS není pevně stanovena, většinou se jako pozitivní výsledek udává množství $> 0,1$ IU/ml (Levin et al. 2019). U malého procenta pacientů se vyskytuje alergie na červené maso, ale krevní test pro IgE protilátky je negativní. V takových případech se provádí IgE test na sérový albumin koček (alergen Fel d 2) a test reakce na vepřovou a hovězí želatinu, popřípadě kožní testy na α -gal obsahující léčebné látky, například cetuximab (Commins 2020). U některých pacientů s nejasnou diagnózou, ale některými symptomy AGS (pozitivní krevní test) se pozorují příznaky po konzumaci nejčastěji vepřového masa (Commins 2020).

Prvním opatřením pro pacienty s diagnostikovaným α -gal syndromem je úplné vyřazení savčího masa z jídelníčku – hovězí, jehněčí, vepřové a zvěřina, stejně tak jako vnitřní orgány těchto zvířat (Commins 2016). Dále je dobré vyhýbat se i ostatnímu savčímu masu, například maso králíčí, kozí, bizoní, koňské ad. (Fischer a Biedermann 2016). Tepelnou úpravou masa se α -gal epitop nezničí, vařením se ale snižuje procento tuku v mase, což může vést k lehčímu průběhu alergie. Někteří pacienti si stěžují na výskyt symptomů způsobených výparů z vařícího se savčího masa (Apostolovic et al. 2014). Stejně jako u jiných potravinových alergií se i terapie AGS řeší s každým pacientem individuálně. Důležité je pacienta seznámit nejen s omezením jídelníčku v podobě vyřazení masa a vnitřních orgánů savců, ale také se skrytými alergeny v produktech. Pacient se musí naučit správně číst etikety výrobků a pozorovat reakce svého těla po konzumaci některých potravin. U částí lidí postižených AGS s neustávajícími symptomy se doporučuje také vyřazení mléčných výrobků, avšak 80-90% pacientů snáší mléko a sýry dobře (Commins 2016). V neposlední řadě se pacienti musí vyhýbat látkám a léčivům obsahujícím α -gal epitop, například cetuximab. Tabulka 1 shrnuje skryté ingredience, které mohou vyvolávat neustávající symptomy AGS. Mnoho pacientů snáší dobře procesované potraviny s obsahem živočišných produktů. Při dodržování velmi striktní diety se navíc zvyšuje riziko vzniku anafylaktického šoku po požití minimálního množství alergenu (Caponetto et al. 2013). Obecně se tedy postiženým AGS doporučuje vyhýbat se potravinám s vysokým obsahem živočišných tuků pocházejících ze savců, zejména

v kombinaci s alkoholem, stresem, fyzickou zátěží, nedostatkem spánku, nemocí či menstruací (Commins et al. 2020). U pacientů s neustávajícími symptomy nebo u rizikových skupin se přistupuje k léčbě medikamenty. Typická léčba může zahrnovat orální antihistaminika, kortikosteroidy, omalizumab nebo metmorfin (Commins 2020).

Tabulka 1: Skryté ingredience schopné vyvolat symptomy AGS (převzato a upraveno z Commins 2020)

Látka	Popis
k. arachidonová	Získává se ze zvířecích jater a tučných částí červeného masa. Je přídavkem krmiv pro domácí zvířata, pleťových krémů a mlék.
biotin	Přítomný v každé živé buňce, ale ve velkém množství se vyskytuje v mléku
karageenan	Polysacharid extrahovaný z červené jedlé mořské řasy; obsahuje α -gal epitop, ale není známé rizikové množství
kastoreum	Výměšek análních pachových žláz bobrů; používá se v některých parfémeh
glycerin	Často se získává z živočišných produktů, ale může být i rostlinného původu
lanolin	Žlutá mazlavá látka vylučovaná mazovými žlázami zvířat tvořících vlnu; přídavek tělových mlék, kosmetiky a léčiv
latex	Může obsahovat kasein (mléčný protein)
mléčné proteiny	Nemusí být označené na etiketě – biotin, kasein, kaseinát, kaseinát sodný, syrovátka
k. myristová	Většinou se získává z ořechů, ale může být i živočišného původu
k. olejová	Většinou získávaná z nejedlého hovězího tuku, ale může být i rostlinného původu
k. stearová	Také jako magnesium stearát; rostlinného i živočišného původu

5.3 Překážka v xenotransplantaci

Inaktivace α 1,3GT vedoucí k produkci přirozených anti-Gal protilátek vytváří imunologickou bariéru při xenotransplantaci prasečích orgánů. Vazba lidských anti-Gal protilátek na miliony α -gal epitopů na každé prasečí buňce vede k rapidnímu odmítání xenotransplantátů (Galili 1993). Odmítnutí je výsledkem buněčné lýzy následované aktivací komplementu vazbou anti-Gal, cytotoxicity závislé na protilátkách (ADCC), při které vazba anti-Gal IgG na α -gal epitopy zprostředkovává vazbu cytolytických efektorových buněk – makrofágů a NK buněk (Galili 1993). Vazba anti-Gal protilátek na α -gal epitopy

endoteliálních buněk krevních cév xenotransplantátu indukuje aktivaci a agregaci destiček způsobující kolaps krevního zásobení transplantátu, ischemii a rapidní odmítnutí. α 1,3GT soutěží s ostatními glykosyltransferázami o stejný akceptorový substrát v Golgiho aparátu, což vedlo vědce ke snaze snížit expresi α -gal epitopů zvýšením množství kompetujících galaktosyltransferáz. α 1,2fukosyltransferáza (Costa et al. 1999), sialyltransferáza (Tanemura et al. 1998) a N-acetylglukosamintransferáza III (Miyagawa et al. 2001) snížily množství exprimovaných α -gal epitopů, nicméně nepodařilo se jim zcela eliminovat tento epitop. I malé množství α -gal epitopu v transplantátu aktivuje anti-Gal B buňky, které tvoří až 1 % lidských B lymfocytů a vede k destrukci xenotransplantátu. Další překážkou xenotransplantace jsou rozdílné prasečí proteiny vedoucí k produkci anti-non gal protilátek, které postupně ničí xenotransplantát (Kwon et al. 2017). Knock-out a knock-in technologie genové manipulace donorových prasat dnes dokážou zvýšit imunologickou toleranci recipientů natolik, že v roce 2021 byla úspěšně transplantována ledvina prasete s KO α 1,3GT. Xenotransplantace jako součást běžné lékařské praxe však zatím neprobíhají.

6 Kooperace

In vivo tvorba imunokomplexů mezi anti-gal a α -gal epitopem na molekulách, patogenech, buňkách a nanočásticích může být použita v imunoterapiích, tzv. α -gal terapiích v mnoha klinických případech. Imunitní procesy aktivované α -gal imunokomplexy zahrnují lokální aktivaci komplementu, který ničí patogeny a generuje chemotaktické faktory přivolávající APC, značení antigenů prezentujících α -gal epitop pro pohlcení APC a aktivaci makrofágů (Galili 2021). Některé z použití α -gal imunokomplexů v terapii zahrnují: 1) zvýšení imunogenicity vakcín proti obaleným virům syntézou α -gal epitopů na povrchu inaktivovaných virů ve vakcíně, čímž zvyšují jejich pohlcování APC; 2) konverze nádorů na protinádorové vakcíny expresí α -gal epitopů na buněčných membránách nádorových buněk; 3) urychlení uzdravování vnitřních i vnějších zranění použitím α -gal nanočástic, které zkracují čas hojení a tvorbu jizev; 4) zvýšení anti-gal zprostředkované ochrany pomocí očkování zvyšujícím produkci anti-gal protilátek proti zoonotickým virům prezentujícím α -gal na svém povrchu a prvokům, například *Trypanosoma*, *Leishmania* a *Plasmodium*. Přítomnost anti-gal protilátek v přirozeně vysokém množství může při napadení parazity exprimujícími α -gal

epitop rovněž způsobovat záněty podobné autoimunitním onemocněním. Účinnost a bezpečnost těchto terapií je testována na transgenních myších a prasatech s KO α 1,3GT.

6.1 Zvýšení imunogenicity vakcín

Vzhledem k přirozenému a relativně vysokému výskytu anti- α -gal protilátek v lidském těle a možnosti poměrně snadno syntetizovat α -gal epitop se vědci snaží využít tuto skutečnost pro zvýšení imunogenicity vybraných vakcín. Jedním z možných směrů k optimalizaci účinnosti virových, mikrobiálních a dalších vakcín je zvýšení jejich pohlcování antigen prezentujícími buňkami. Některé vakcíny (influenza, HIV) nemají optimální účinnost, jelikož jejich složky nejsou dostatečně pohlcovány antigen-prezentujícími buňkami. Pokud vakcína exprimuje α -gal epitopy, anti-gal protilátky s ní tvoří imunokomplexy, které jsou efektivně pohlcovány APC přes interakci Fc části imunokomplexů anti-galu a Fc γ receptoru APC (Abdel-Motal et al. 2007). APC poté v lymfatické uzlině prezentují antigen na MHC molekulách specifickým T buňkám. Vakcína proti chřipce sestává převážně z virového glykoproteinu hemaglutininu (HA) a je podávána intramuskulárně. Hemaglutinin je pohlcován APC. K dostatečnému rozvoji imunitní odpovědi je zapotřebí, aby APC antigeny pohltily a rozložily je na peptidy. Ty následně prezentují na MHC I nebo MHC II komplexech T-lymfocytům v lymfatické uzlině. Efektivní aktivace Th a Tc lymfocytů je základním předpokladem účinné specifické imunitní odpovědi. Úspěšnosti chřipkové vakcíny brání nedostatečné pohlcování hemaglutininu antigen-prezentujícími buňkami. Vstřebávání antigenů je minimální a omezené na náhodnou endocytózu (Macher a Galili 2008).

Připojením α -gal epitopu na jeden ze sacharidových řetězců hemaglutininu vede *in situ* k vazbě anti-gal IgG a tvorbě imunokomplexů. APC exprimují receptor Fc γ R, který se efektivně váže na Fc část IgG molekuly (Capel et al. 1994). Zvýšení efektivity se přisuzuje opsonizaci, nejefektivnějšímu mechanismu rozpoznávání APC (Capel et al. 1994). Většina virů chřipky má na HA 6-8 N-sacharidových řetězců (Keil et al. 1985). Na sacharidových řetězcích se nachází N-acetylglukosamin (Gal β 1-4GlcNAc-R) (Keil et al. 1985). α -gal může být následně syntetizován s použitím rekombinantní α 1,3GT a UDP-Gal (Henion et al. 1997).

Zvýšení imunogenicity vakcín bylo testováno na myších s α 1,3GT knockoutem (Thall et al. 1995). Ukázalo se, že myši s KO α 1,3GT vakcinované inaktivním virem s α -gal epitopy

měly až stonásobně více anti-influenza protilátek a zvýšenou T buněčnou odpověď než myši očkované vakcínou bez α -gal epitopů (Abdel-Motal et al. 2007). Zároveň byly očkované myši vystaveny intranasální infekci živým virem a byla pozorována mortalita v průběhu 1 měsíce. Myši s KO α 1,3GT očkované vakcínou s α -gal epitopy měly úmrtnost 11 %, zatímco myši vakcinované virem bez α -gal epitopů umíraly v 89 % případů (Abdel-Motal et al. 2007).

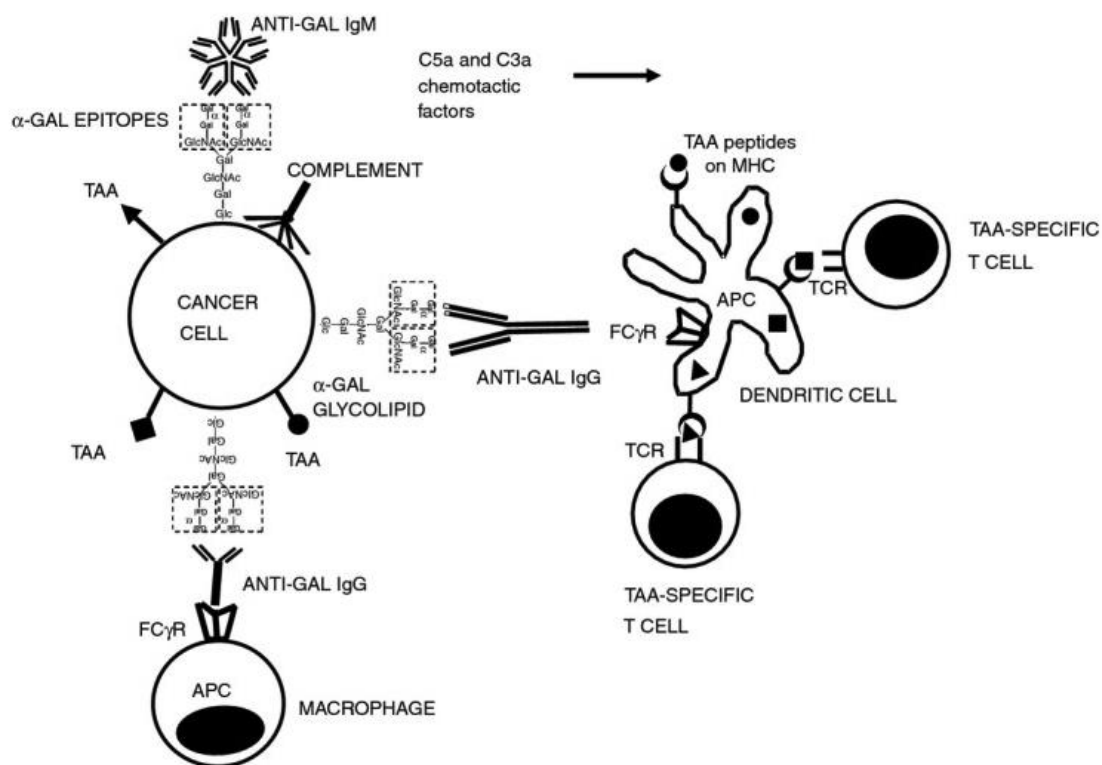
Velmi podobným způsobem by se dala zvýšit imunogenicita HIV vakcín. Hlavním glykoproteinem virového obalu HIV je gp120 s 13-16 komplexními sacharidovými řetězci. Při produkci rekombinantního proteinu v CHO (Chinese hamster ovary cells) buňkách získávají gp120 sacharidové řetězce terminální strukturu SA-Gal β 1-4GlcNAc-R (Leonard et al. 1990). Tato struktura může být konvertována na α -gal epitop použitím neuraminidáz pro odstranění k. sialové a následně α 1,3GT a UDP-Gal (Abdel-Motal et al. 2006). Tento princip zvýšení imunogenicity vakcín lze použít pro jakoukoliv vakcínu obsahující sacharidové řetězce komplexního typu. Výjimkou jsou vakcíny, jejichž antigenní epitopy by byly ohroženy syntézou α -gal epitopu, například vakcíny obsahující zbytky lysinu (Macher a Galili 2008).

6.2 Léčba nádorů pomocí α -gal

Nádorové buňky na sobě nesou škálu specifických antigenů. Anti-gal může být využit pro vyvolání ochranné imunitní odpovědi proti metastázám zvýšením imunogenicity nádorových antigenů (TAA) na nádorových buňkách. Pouze některé z těchto antigenů se podařilo identifikovat. Část antigenů totiž nádory sdílejí se zdravými buňkami a velké množství z nich je jedinečné pro daný tumor a individuálního pacienta. Úspěšná imunitní odpověď zahrnuje pohlcení nádorových buněk APC pro prezentaci antigenu. Jednou z charakteristik buněk rakoviny je eliminace markerů označující karcinogenní buňky APC buňkám. Zvýšení imunogenicity TAA pomocí syntézy α -gal epitopu a následné očkování těmito buňkami by mohlo antigen prezentujícím buňkám pomoci metastázující nádorové buňky najít, pohltit a úspěšně prezentovat. Jelikož jsou TAA charakteristické pro každý nádor a individuálního pacienta, nádor jako takový je praktickým zdrojem buněk pro konverzi ve vakcínu. Imunogenicita TAA je zvýšena syntézou α -gal epitopů. Předpokládá se, že vazba anti-Gal na nádorové buňky uměle exprimující α -gal epitop zvyšuje efektivitu pohlcování těchto antigenů APC přes Fc/ Fc γ interakci. Tím se samotný nádor mění ve vakcínu individuální pro daný tumor a pacienta (Galili 2013).

Nádorové buňky několika pacientů s hematologickými nádory (leukémie, lymfom, myelom) byly *in vitro* modifikovány k expresi α -gal epitopu inkubací s neuroaminidázou, rekombinantní α 1,3GT a UDP-Gal (Galili et al. 1997). Po inaktivaci živých buněk nádoru byla tato vakcína podána myši s KO α 1,3GT. Jako model nádoru byla použita linie myších nádorových buněk melanom B16, které také neexprimují α -gal epitopy, stejně jako lidské nádorové buňky. B16 buňky exprimující α -gal epitop byly vytvořeny pomocí tranfekce plazmidem obsahujícím α 1,3GT gen, transdukci adenovirovým vektorem nebo retrovirem (Rossi et al. 2005). Imunizace myši s KO α 1,3GT B16 buňkami exprimujícími α -gal epitop vedlo k nastartování imunitní odpovědi chránící myši proti B16 nádorovým buňkám (Rossi et al. 2005). Imunizace nevedla u myši k rozvoji autoimunitních onemocnění (Rossi et al. 2005).

V pokročilém stádiu rakoviny se metastázující buňky oddělují od primárního tumoru a vznikají léze, které jsou těžce odstranitelné. I malé množství nezničených kancerogenních buněk vede k opakovanému rozvoji onemocnění. Metoda využívající α -gal funguje pro destrukci viditelných lézí a jejich konverzi v endogenní vakcíny vyvolávající imunitní odpověď cílenou na mikrometastázující rakovinné buňky (Galili et al. 2007). *In situ* se používají α -gal epitopy obsahující glykolipidy buněčných membrán králíčích erytrocytů. α -gal epitop obsahující glykolipidy rozpuštěné ve vodě tvoří micely. Ty interagují s membránou nádorových buněk a s anti-gal protilátkami. Spouštějí tak aktivaci komplementu, generují chemotaktické složky C5a a C3a, čímž vyvolávají lokální zánět. Nádorové buňky jsou zničeny podobně jako buňky xenotransplantátu. α -gal navíc opsonizuje nádorové buňky pro jejich efektivní pohlcení APC a tím aktivaci specifických T-buněk.



Obrázek 6: Vazba antigen prezentujících buněk (APC) na nádorové buňky pomocí anti-Gal IgG a IgM protilátek (převzato z Galili 2013)

Imunoterapie využívající injekci glykolipidů obsahujících α -gal epitop do buněk nádoru prošla první fází klinického testování u pacientů s maligními nádory v pokročilém stádiu onemocnění (Whalen et al. 2012). Pacienti po injekci 0,1, 1 a 10 mg α -gal glykolipidů nevykazovali žádné známky toxicity ani autoimunitní reakce. Některým z pacientů injekce α -gal glykolipidů prodloužila život, zatímco u jiných takové výsledky zaznamenány nebyly (Whalen et al. 2012). Imunoterapie α -gal glykolipidy může být možností léčby nádoru před jeho chirurgickým odstraněním. Injekce glykolipidů do buněk tumoru krátce po diagnóze rakoviny může sloužit jako přechodná vakcína učící imunitní systém pacienta rozpoznávat a ničit metastázující buňky tumoru prezentující odpovídající TAA (Galili 2013).

6.3 α -gal nanočástice

Aplikace α -gal nanočástic na různá zranění včetně popálenin zvyšuje rychlost procesu hojení pomocí přirozeně se vyskytujících anti-Gal protilátek. α -gal nanočástice zahrnují

glykolipidy s několika α -gal epitopy, fosfolipidy a cholesterol. Vazba anti-Gal na α -gal nanočástice aktivuje kaskádu komplementu, která generuje chemotaktické faktory C3a a C5a. To vede k migraci makrofágů a neutrofilů do místa poranění. Makrofágy pomocí fagocytózy očistí zraněné místo od mrtvých či poškozených buněk společně s pohlcením možných antigenů, které následně prezentují buňkám specifické imunity (Galili 2015). Množství neutrofilů v místě výskytu α -gal nanočástic se po 48h blíží nule, zatímco počet makrofágů roste (Huai et al. 2016). Interakce Fc/Fc γ receptorů mezi α -gal nanočásticemi obalenými anti-Gal protilátkami a makrofágy aktivuje makrofágy k produkci cytokínů a růstových faktorů. Ty podporují migraci kmenových buněk do místa poranění a urychlují proces hojení. Léčba poranění α -gal nanočásticemi vede ke 40-60 % snížení času potřebného k hojení (Huai et al. 2016). To je asociováno s vyšším počtem makrofágů, rychlejší angiogenezí a obnovou epidermis a regenerací dermis. Použití nanočástic může eliminovat tvorbu fibróz a jizev díky sníženému času hojení. Poranění léčená α -gal nanočásticemi u myši s KO α 1,3GT vedlo k obnově vlasových folikulů, mazových žláz, tukových a svalových buněk (Huai et al. 2016). Vzhledem ke stejnému mechanismu hojení vnitřích zranění lze tento postup léčby použít i pro tyto účely. α -gal nanočástice jsou vysoce stabilní a při skladování v rozmezí teplot -20–4 °C je možné je používat až po dobu 4 let. Na poranění lze nanočástice aplikovat ve formě suspenze, aerosolu, pěny nebo jako součást obkladů (Galili 2015).

6.4 Rezistence vůči patogenům

Anti-Gal protilátky jsou produkovány v procesu imunizace proti střevní mikrobiotě. Malé množství střevních bakterií zdravých jedinců na svém povrchu exprimuje α -gal epitop. Geny s α 1,3GT aktivitou byly sekvenováním genomu střevního mikrobiomu nalezeny u 71 % jedinců z Human Microbiome Project, 93 % jedinců z LifeLines DEEP studie a u 95 % účastníků multigenerační Asian American studie (Montassier et al. 2019). Identifikované geny s α 1,3GT aktivitou byly nalezeny zejména u rodů Enterobacteriaceae (*E. coli*), Pasteurellaceae (*H. influenza*) a Lactobacillaceae (*Lactobacillus sp.*) (Montassier et al. 2019). Přítomnost α -gal epitopu na povrchu těchto bakterií je asociována s bakteriální stěnou a vrstvou glykoproteinů, stejně jako s výskytem lipopolysacharidů (LPS). Zatím nejsou všechny bakterie obsahující geny pro α -gal epitop identifikované. Je ale pravděpodobné, že α 1,3 GT

pozitivní bakterie střevního mikrobiomu generují anti-Gal protilátky v prvních letech života jedince a vytvářejí tak anti-Gal protilátky produkující frakci B buněk. Hladina anti-Gal protilátek může být ovlivněna AB0 krevními skupinami, věkem, pohlavím, stravou a infekcemi trávicího traktu. Vzhledem k vysoké diverzitě genů pro syntézu α -gal epitopu je odhadováno mnohem vyšší množství sekvencí s α 1,3GT aktivitou v genomu bakterií a zatím neidentifikovaných virů a parazitů mikrobiomu (Montassier et al. 2019).

Anti-Gal protilátky jsou cytotoxické pro α -gal exprimující patogeny. To bylo demonstrováno *in vitro* pro bakterie, prvoky a viry s α -gal epitopem (Yilmaz et al. 2014). Anti-gal zprostředkovává některým jedincům zvýšenou ochranu před infekcí *Trypanosoma cruzi*. U jiných však vyvolává autoimunitní fenomén, tzv. Chagasovu nemoc. Přítomnost *Trypanosoma cruzi* 10–30 x zvyšuje obsah anti-gal protilátek v krvi v porovnání s nenakaženými jedinci (Winand et al. 1993). Na buněčné membráně *T. cruzi* se vyskytuje několik α -gal epitopů na řetězcích glykoinositolfosfolipidů a lipofosfoglykanů (Almeida et al. 1994). Anti-gal protilátky se váží na epitopy *T. cruzi* a vyvolávají komplementem indukovanou lýzu patogenů (Towbin et al. 1987). Anti- α -gal protilátky tak přispívají k ochraně hostitele před parazitem. Nicméně *T. cruzi* může být komplementem zničena pouze mimo buňku. Intracelulárně parazit nadále produkuje a vypouští glykoinositolfosfolipidy a lipofosfoglykany s α -gal epitopem (Souto-Padron et al. 1994). To stimuluje buňky IS k pokračování produkce vysokého množství anti-gal protilátek, které interagují s α -gal epitopy a vyvolávají akutní zánět, který může přejít v chronický – akutní a chronická Chagasova nemoc. α -gal epitop je také exprimován na glykoinositolfosfolipidech *T. brucei*, *Leishmania mexicana* a *Leishmania major* (Ramasamy a Field 2012, Schneider et al. 1994). Podobné anti-gal zprostředkované zánětlivé reakce mohou vznikat adhezí anti-gal protilátek na bakteriální fragmenty exprimující sacharidové epitopy podobné struktuře α -gal epitopu. Adheze anti-gal protilátek k antigenům buněk gastrointestinálního traktu, močového traktu a dalších tkání může vést k anti-gal zprostředkované destrukci buněk komplementem nebo k protilátkově dependentní buněčné cytotoxicitě (Galili 2013).

Malárie je onemocnění způsobené infekcí *Plasmodium sp.* přenášených samicemi komára *Anopheles*. Výskyt malárie výrazně ovlivnil evoluci primátů, včetně člověka. Transmise patogenů bývá většinou úspěšná, ale onemocnění se rozvine pouze u zlomku nakažených. To poukazuje na přirozený mechanismus ochrany, který pravděpodobně cílí na prvotní fáze životního cyklu *Plasmodium sp.*, krátce po přenosu parazita (Yilmaz et al. 2014). α -gal epitop

byl objeven na povrchu sporozoitů *P. falciparum*, *P. berghei* a *P. yoelii* (Galili et al. 1985). Jestli je α -gal detekovaný na povrchu sporozoitů produkovaný *Plasmodium sp.* a/nebo komár není zatím jasné. Hladina anti-Gal IgM protilátek u dospělých s historií infekce malárií byla více než dvakrát vyšší než u dospělých bez předchozí expozice. U dětí nebyly takové rozdíly pozorovány. Množství IgG anti-Gal protilátek bylo stejné mezi dospělými vystavenými infekci a zdravými jedinci. Infekčnost *P. falciparum* je tedy pravděpodobně snižována anti-Gal IgM specifickou odpovědí, nikoliv pouze IgG protilátkami. Protektivní funkce anti-Gal IgM protilátek byla testována na myších s delecí α 1,3GT genů, které byly kolonizovány bakterií *E. coli 086:B7*. Takové myši byly chráněny před transmisí *Plasmodium sp.* nikoliv však před infekcí samotnou jakmile se sporozoitů dostanou do patogenního stádia (Yilmaz et al. 2014). Ochrannou funkci IgM protilátek zvyšují některé specifické subtypy IgG protilátek (IgG2b, IgG3), pokud jsou přítomny v dostatečném množství. Po navázání IgM, IgG2b a IgG3 na povrch sporozoitů aktivují protilátky klasickou cestu komplementu. Aktivace komplementu generuje chemoatraktanty C3a a C5a, které spouští IgG závislou polymorfonukleární (PMN) buněčnou cytotoxicitu (Yin et al. 2004). Toxicita anti-Gal protilátek je přímo závislá na přítomnosti komplementu a PMN buněk. Anti-Gal protilátky poskytují podobnou ochranu před dalšími patogeny s α -gal epitopem na svém povrchu, např. *Leishmania sp.* a *Trypanosoma sp.*

7 Diskuse

Molekuly klíštěcích slin jsou neustále v popředí zájmu. Široký repertoár imunomodulačních a antihemostatických sloučenin nabízí rozsáhlé možnosti farmakologického i medicínského využití. Aktuální je také snaha o vytvoření účinných protiklíštěcích vakcín, které by byly schopné zamezit přenosu některých patogenů a snížit úspěšnost klíšťat při krmení či rozmnožování.

Utlumení imunitních a hemostatických reakcí hostitele slinami klíšťat využívá řada patogenů. Oslabený imunitní systém je nedokáže rozpoznat, správně prezentovat ani zničit, což umožňuje jejich snadnější přenos i rozvoj infekce. Takto svou transmisí zvyšuje například *B. burgdorferi*, TBE virus nebo *A. phagocytophylum*.

Sliny klíšťat jsou velmi komplexní a mají mnoho funkcí. Během krmení se jejich složení mění, zejména u ixoidních klíšťat. Navazující studie by se měly zaměřit na evoluci složení a aktivity klíštěcích slin. Zejména porovnání s evolučním reliktem, *N. namaqua*, by mělo pomoci porozumět životním strategiím této úspěšné skupiny obligátních parazitů. Mimo jiné může znalost klíštěcích slin přinést hlubší poznatky o obranných mechanismech obratlovců.

Jednou z intenzivně zkoumaných molekul klíštěcích slin je oligosacharid α -gal, který lidé jako jedni z mála savců postrádají. Jeho přítomnost na povrchu střevních bakterií a virů stimuluje imunitní systém člověka k tvorbě anti- α -Gal protilátek. α -gal epitop je v klíštěcích slinách pravděpodobně nezbytnou podmínkou pro úspěšné krmení, jelikož knockout genů s α 1,3GT aktivitou vede ke zvýšené mortalitě (Caberaz-Cruz et al. 2018). Dalším vysvětlením může být snaha o napodobení glykanů přirozených hostitelů za účelem vyhnutí se detekci imunitním systémem.

Inaktivace α 1,3GT se v evoluci objevuje poměrně nedávno. Ze savčí říše nosí tuto mutaci pouze lidé, lidoopi a ploskonosé opice. Delece v genu byly pravděpodobně důsledkem selekčního tlaku vyvolaného infekčním agens a α -gal nebo α -galu podobným epitopem na svém povrchu (Macher a Galili 2008). Tím byli zvýhodněni jedinci vytvářející anti- α -Gal protilátky schopné ochránit nositele před patogeny s α -gal epitopy.

Dnes nás anti- α -Gal protilátky stále chrání před některými patogeny. Způsobují ale také řadu obtíží. Klíštěcí kousnutí může přenosem α -gal antigenů u některých jedinců způsobovat alergické reakce, tzv. α -gal syndrom. Taková alergie znemožňuje postiženému konzumaci červeného masa, znesnadňuje léčbu rakoviny cetuximabem a v některých případech vede k anafylaktickým šokům. U pacientů s AGS trpících rakovinou lze použít čistě lidskou monoklonální protilátku panitumumab. Ta ovšem nevykazuje tak vysokou účinnost jako cetuximab (O'Neil et al. 2007).

Celkové množství případů AGS není známé, jelikož řada pacientů je nesprávně diagnostikována. Chybí dostatek studií potvrzujících vztah mezi napadením klíštětem a rozvojem AGS. Zvyšování povědomí o α -gal syndromu mezi zdravotníky je prvním krokem ke zjištění skutečného rozsahu této alergie. V oblastech endemických pro klíšťata by se mělo testování na α -gal specifické IgE protilátky stát běžnou součástí vyšetření pacientů s případy opakované anafylaxe, kopřivky nebo otoku a gastrointestinálních křečí bez jiné zjevné příčiny. Důvodem nedostatečného testování pacientů je i zmatek v informacích o parametrech testů. Další studie by se na tento problém měly zaměřit.

Anti- α -Gal protilátky také vytvářejí bariéru v xenotransplantaci. Dnes již díky pokročilým metodám genové editace, zejména CRISPR/Cas9, existují možnosti překonání této bariéry vývojem prasat postrádajících α -gal epitop a další xenoantigeny (Naeimi Kararoudi et al. 2018). Xenotransplantace orgánů modifikovaných prasat primátům jsou momentálně předmětem preklinického testování. Zároveň jsou neustále objevovány nové xenoreaktivní antigeny, což žene nové genové editace a produkci transgenních prasat kupředu (Zhang et al. 2017). Preklinické testování rozdílných modelů geneticky modifikovaných prasat v kombinaci s imunosupresivní terapií v NHP (non-human primates) je finančně náročné, ale prozatím je to jediný optimální způsob výběru genetické úpravy prasečích dárců a strategie imunosupresivní terapie pro budoucí úspěšné transplantace.

Přirozeně vysoký výskyt anti- α -Gal protilátek v těle zdravých lidí lze využít v klinické praxi ke zvýšení imunogenicity virových a jiných vakcín. Glykanová schránka obalených virů pomáhá patogenu vyhnout se imunitní odpovědi, ať už snížením pohlcování viru APC nebo maskováním imunogenních peptidů. Umělou syntézou α -gal epitopů na N-glykanech virového obalu se vakcína stane rychlým cílem antigen prezentujících buněk díky interakci Fc γ receptoru APC s Fc fragmentem anti- α -Gal protilátek vážících se na α -gal epitopy vakcíny. Syntéza α -gal epitopů je poměrně snadno proveditelná reakcí s rekombinantní α 1,3GT a UDP-Gal nebo replikací viru v hostitelské buňce obsahující několik kopií genu α 1,3GT (Henion et al. 1997). V experimentálním modelu α 1,3GT KO myši vedla vazba anti- α -Gal protilátek na α -gal epitopy chřipkové nebo gp120 HIV vakcíny k opsonizaci a účinnému pohlcení a zpracování antigenů prezentujícími buňkami. Klinické testy prokázaly bezpečnost takto upravených vakcín k použití na zdravých jedincích. Nicméně pacienti s AGS nebo ti, kteří byli vystaveni opakovanému napadení klíšťaty, by měli být obezřetní.

Imunizace buňkami tumoru, které byly editované k expresi α -gal epitopů je další nadějnou α -gal terapií využívající tvorbu imunokomplexů. Injekce α -gal glykolipidů do nádoru vede k jejich začlenění do buněčných membrán rakovinných buněk. To zviditelňuje nádor buňkám imunitního systému a dochází k jeho destrukci podobným způsobem jako odmítnutí xenotransplantátu. Výsledkem je konverze léčeného karcinomu v endogenní protinádorovou vakcínu. Díky posílení imunitní odpovědi v reakci na takto upravené nádory dokáže IS v některých případech zničit i metastázující stádia rakoviny. Tato terapie se ukázala být účinná v myších modelech produkujících anti- α -Gal protilátky. Další slibnou α -gal terapií je použití

α -gal nanočástic, které urychlují hojení vnitřních i vnějších zranění. Jejich použití by mohlo mimo jiné vést i k regeneraci periferních nervů a míchy. Budoucí výzkum by měl vést k vývoji α -gal terapií v různých klinických prostředích a zhodnocení bezpečnosti takových terapií u pacientů s AGS.

Anti- α -Gal protilátky se v těle přirozeně tvoří v odpovědi na stimulaci α -gal obsahujícími bakteriemi a viry střevní mikroflóry. Vzhledem k vysoké diverzitě genů pro syntézu α -gal epitopu je odhadováno mnohem vyšší množství sekvencí α 1,3GT v genomu bakterií a zatím neidentifikovaných virů a parazitů lidských střev. Navíc nejsou všechny geny kódující enzym α 1,3GT známy. Například na pili bakterie *N. meningitidis* se váží anti- α -Gal protilátky, ale odpovídající gen pro enzym α 1,3GT nebyl v genomu patogenu nalezen. Některé geny kódující jiné galaktosyltransferázy, které by mohly vykazovat α 1,3GT aktivitu, byly objeveny u *S. pneumoniae* a *E. coli* (Han et al. 2012). Střevní mikroflóra je schopná ovlivňovat imunitu člověka a rezistenci vůči infekci. Xenoglykany exprimované specifickými komponentami střevního mikrobiomu mohou vyvolávat imunitní odpověď proti patogenům obsahujícím stejné glykany. Tento přirozený mechanismus ochrany může být zvýšen imunizací s adjuvanciemi posilujícími produkci anti- α -Gal protilátek. Pokud je taková imunizace spojená například s antigeny původce malárie, mohlo by dojít ke zvýšení imunogenicity antigenů prvoka, a tím ke zvýšení efektivity vakcín proti malárii. Podobným způsobem mohou fungovat i další anti-glykanové protilátky, ať už proti malárii či jiným onemocněním. V neposlední řadě poskytují anti- α -Gal protilátky podobnou ochranu proti *Leishmania spp.* a *Trypanosoma spp.*, což udává směr navazujících výzkumů. Je také možné, že manipulace s anti- α -Gal protilátkami prostřednictvím poznatků o střevním mikrobiomu může přispět ke sjednocení příčin vzniku autoimunitních onemocnění. Zvláště pak v případech roztroušené sklerózy, při které je hladina anti- α -Gal protilátek velmi nízká. Nicméně přímá role anti- α -Gal protilátek v rozvoji tohoto onemocnění je zatím spekulativní.

8 Závěr

Klíšťata disponují bezpochyby nejkompexnějším složením slin z celé živočišné říše, což z nich činí velmi úspěšné parazity. Arsenál obranných sloučenin využívají nejen lidé, ale i některé patogeny, které tak zvyšují svůj přenos a infekčnost. Molekuly klíštěcích slin poskytují možnosti rozsáhlého farmakologického a medicínského využití. Zvláště nadějně je použití oligosacharidu α -gal, který je také součástí klíštěcích slin. Tvorba imunokomplexů s anti-Gal protilátkami otevírá cestu tzv. α -gal terapiím s potenciálem širokého využití v klinické praxi.

9 Abecední seznam zkratk

ADCC	antibody dependent cellular cytotoxicity
ADP	adenosindifosfát
AGS	alfa-gal syndrom
AK	aminokyselina
APC	antigen presenting cell
ATR	acquired tick resistance
CCL	ligand chemokinového receptoru
CCR	chemokinový receptor
CLIPA3	protein ze slin <i>Aedes aegypti</i>
CLR	C lectin receptor
CTL	cytotoxic T lymphocyte
DC	dendritic cell
EGFR	epidermal growth factor receptor
ErbB	rodina proteinových receptorů tyrozinových kináz
FGF	fibroblast growth factor
GA	Golgiho aparát
GALT	galactose-1-phosphate uridylytransferase
GP	glykoprotein
GT	galaktosyltransferáza
HIV	human immunodeficiency virus
HRF	histamine releasing factor
HSR	hypersenzitivní reakce
CHO	chinese hamster ovary
IFN	interferon
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
IRIS	<i>I. ricinus</i> serpin
IS	imunitní systém
ISAC	<i>I. scapularis</i> anti-complement

KO	knock out
MAPK	mitogen activated protein kinase
MGF	mesenchymal growth factor
MHC	major histocompatibility complex
NK	natural killer
NMR	nukleární magnetická rezonance
OmCI	<i>O. moubata</i> C inhibitor
Osp	outer surface protein
PDGF	platelet-derived growth factor
PMN	polymorfonukleární buňky
PRM	pattern recognition molecule
RANTES	druh chemokinu T buněk
RIA	radioimmunoassay
Salp	salivary gland protein
SAT	saliva assisted transmission
SGE	salivary gland extract
STARI	southern tick-associated rash illness
TAA	tumor associated antigen
TBE virus	tick-borne encephalitis virus
TF	tkáňový faktor
TFPI	tissue factor pathway inhibitor
TGF-beta	transforming growth factor beta
tHRF	tick histamine release factor
TNF	tumor necrosis factor
TSLPI	tick salivary lectin pathway inhibitor
UDP-Gal	uridine diphosphate-galactose
VLDL	very low density lipoproteins
vWf	von Willebrandův faktor

10 Citace

- Abdel-Motal, U.M. *et al.* (2007) 'Immunogenicity of influenza virus vaccine is increased by anti-gal-mediated targeting to antigen-presenting cells', *Journal of Virology*, 81(17), pp. 9131–9141. doi:[10.1128/JVI.00647-07](https://doi.org/10.1128/JVI.00647-07).
- Alekseev, A.N. *et al.* (1991) '[The possible role of the salivary gland substrate in ixodid ticks as an adjuvant enhancing arbovirus transmission]', *Meditinskaja Parazitologija I Parazitarnye Bolezni*, (1), pp. 28–31.
- Allen, J.R., Khalil, H.M. and Graham, J.E. (1979) 'The location of tick salivary antigens, complement and immunoglobulin in the skin of guinea-pigs infested with *Dermacentor andersoni* larvae', *Immunology*, 38(3), pp. 467–472.
- Anderson, J.M., Ammerman, N.C. and Norris, D.E. (2004) 'Molecular differentiation of metastriate tick immatures', *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*, 4(4), pp. 334–342. doi:[10.1089/vbz.2004.4.334](https://doi.org/10.1089/vbz.2004.4.334).
- Anguita, J. *et al.* (2002) 'Salp15, an ixodes scapularis salivary protein, inhibits CD4(+) T cell activation', *Immunity*, 16(6), pp. 849–859. doi:[10.1016/s1074-7613\(02\)00325-4](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(02)00325-4).
- Apostolovic, D. *et al.* (2014) 'Immunoproteomics of processed beef proteins reveal novel galactose- α -1,3-galactose-containing allergens', *Allergy*, 69(10), pp. 1308–1315. doi:[10.1111/all.12462](https://doi.org/10.1111/all.12462).
- Barker, S.C. and Walker, A.R. (2014) 'Ticks of Australia. The species that infest domestic animals and humans', *Zootaxa*, (3816), pp. 1–144. doi:[10.11646/zootaxa.3816.1.1](https://doi.org/10.11646/zootaxa.3816.1.1).
- Berg, E.A., Platts-Mills, T.A.E. and Commins, S.P. (2014) 'Drug allergens and food—the cetuximab and galactose- α -1,3-galactose story', *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 112(2), pp. 97–101. doi:[10.1016/j.anai.2013.11.014](https://doi.org/10.1016/j.anai.2013.11.014).
- Bergman, D.K. *et al.* (2000) 'Isolation and molecular cloning of a secreted immunosuppressant protein from *Dermacentor andersoni* salivary gland', *The Journal of Parasitology*, 86(3), pp. 516–525. doi:[10.1645/0022-3395\(2000\)086\[0516:IAMCOA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2000)086[0516:IAMCOA]2.0.CO;2).
- Binnington, K.C. and Kemp, D.H. (1980) 'Role of tick salivary glands in feeding and disease transmission', *Advances in Parasitology*, 18, pp. 315–339. doi:[10.1016/s0065-308x\(08\)60403-0](https://doi.org/10.1016/s0065-308x(08)60403-0).
- Bircher, A.J. and Hofmeier, K.S. (2012) 'Drug hypersensitivity reactions: Inconsistency in the use of the classification of immediate and nonimmediate reactions', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 129(1), pp. 263–264. doi:[10.1016/j.jaci.2011.08.042](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.08.042).
- Bishop, J.R. and Gagneux, P. (2007) 'Evolution of carbohydrate antigens—microbial forces shaping host glycomes?', *Glycobiology*, 17(5), pp. 23R–34R. doi:[10.1093/glycob/cwm005](https://doi.org/10.1093/glycob/cwm005).
- Blick, S.K.A. and Scott, L.J. (2007) 'Cetuximab: a review of its use in squamous cell carcinoma of the head and neck and metastatic colorectal cancer', *Drugs*, 67(17), pp. 2585–2607. doi:[10.2165/00003495-200767170-00008](https://doi.org/10.2165/00003495-200767170-00008).
- Bochner, B.S. *et al.* (1990) 'IL-3 augments adhesiveness for endothelium and CD11b expression in human basophils but not neutrophils.', *The Journal of Immunology*, 145(6), pp. 1832–1837.
- Brockow, K. *et al.* (2015) 'Using a gluten oral food challenge protocol to improve diagnosis of wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis', *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 135(4), pp. 977–984.e4. doi:[10.1016/j.jaci.2014.08.024](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.08.024).
- Cabezas-Cruz, A. *et al.* (2015) 'Regulation of the Immune Response to α -Gal and Vector-borne Diseases', *Trends in Parasitology*, 31(10), pp. 470–476. doi:[10.1016/j.pt.2015.06.016](https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.06.016).

- Cabezas-Cruz, A. *et al.* (2018) 'Tick galactosyltransferases are involved in α -Gal synthesis and play a role during *Anaplasma phagocytophilum* infection and *Ixodes scapularis* tick vector development', *Scientific Reports*, 8(1), p. 14224. doi:[10.1038/s41598-018-32664-z](https://doi.org/10.1038/s41598-018-32664-z).
- Campbell, J.J. *et al.* (1999) 'The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells', *Nature*, 400(6746), pp. 776–780. doi:[10.1038/23495](https://doi.org/10.1038/23495).
- Capel, P.J. *et al.* (1994) 'Heterogeneity of human IgG Fc receptors', *ImmunoMethods*, 4(1), pp. 25–34. doi:[10.1006/immu.1994.1004](https://doi.org/10.1006/immu.1994.1004).
- Caponetto, P., Fischer, J. and Biedermann, T. (2013) 'Gelatin-containing sweets can elicit anaphylaxis in a patient with sensitization to galactose- α -1,3-galactose', *The Journal of Allergy and Clinical Immunology. In Practice*, 1(3), pp. 302–303. doi:[10.1016/j.jaip.2013.01.007](https://doi.org/10.1016/j.jaip.2013.01.007).
- Carvalho-Costa, T.M. *et al.* (2015) 'Immunosuppressive effects of *Amblyomma cajennense* tick saliva on murine bone marrow-derived dendritic cells', *Parasites & Vectors*, 8(1), p. 22. doi:[10.1186/s13071-015-0634-7](https://doi.org/10.1186/s13071-015-0634-7).
- Cavassani, K.A. *et al.* (2005) 'Tick saliva inhibits differentiation, maturation and function of murine bone-marrow-derived dendritic cells', *Immunology*, 114(2), pp. 235–245. doi:[10.1111/j.1365-2567.2004.02079.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.02079.x).
- Chen, C. *et al.* (2016) 'Biochemical characterization of the novel α -1, 3-galactosyltransferase WcIR from *Escherichia coli* O3', *Carbohydrate Research*, 430, pp. 36–43. doi:[10.1016/j.carres.2016.04.012](https://doi.org/10.1016/j.carres.2016.04.012).
- Chen, G. *et al.* (2012) '*Ixodes scapularis* saliva mitigates inflammatory cytokine secretion during *Anaplasma phagocytophilum* stimulation of immune cells', *Parasites & Vectors*, 5, p. 229. doi:[10.1186/1756-3305-5-229](https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-229).
- Chinuki, Y. *et al.* (2016) 'Haemaphysalis longicornis tick bites are a possible cause of red meat allergy in Japan', *Allergy*, 71(3), pp. 421–425. doi:[10.1111/all.12804](https://doi.org/10.1111/all.12804).
- Chmelar, J. *et al.* (2012) 'Tick salivary secretion as a source of antihemostatics', *Journal of Proteomics*, 75(13), pp. 3842–3854. doi:[10.1016/j.jprot.2012.04.026](https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.04.026).
- Chmelař, J. *et al.* (2016) 'Sialomes and Mialomes: A Systems-Biology View of Tick Tissues and Tick-Host Interactions', *Trends in Parasitology*, 32(3), pp. 242–254. doi:[10.1016/j.pt.2015.10.002](https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.10.002).
- Chung, C.H. *et al.* (2008) 'Cetuximab-induced anaphylaxis and IgE specific for galactose- α -1,3-galactose', *The New England Journal of Medicine*, 358(11), pp. 1109–1117. doi:[10.1056/NEJMoa074943](https://doi.org/10.1056/NEJMoa074943).
- Commins, S.P. *et al.* (2009) 'Delayed anaphylaxis, angioedema, or urticaria after consumption of red meat in patients with IgE antibodies specific for galactose- α -1,3-galactose', *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 123(2), pp. 426–433. doi:[10.1016/j.jaci.2008.10.052](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.10.052).
- Commins, S.P. *et al.* (2011) 'The relevance of tick bites to the production of IgE antibodies to the mammalian oligosaccharide galactose- α -1,3-galactose', *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(5), pp. 1286–1293.e6. doi:[10.1016/j.jaci.2011.02.019](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.02.019).
- Commins, S.P. *et al.* (2014) 'Delayed clinical and ex vivo response to mammalian meat in patients with IgE to galactose- α -1,3-galactose', *The Journal of allergy and clinical immunology*, 134(1), pp. 108–115.e11. doi:[10.1016/j.jaci.2014.01.024](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.01.024).
- Commins, S.P. (2016) 'Invited Commentary: Alpha-Gal Allergy: Tip of the Iceberg to a Pivotal Immune Response', *Current Allergy and Asthma Reports*, 16(9), p. 61. doi:[10.1007/s11882-016-0641-6](https://doi.org/10.1007/s11882-016-0641-6).
- Commins, S.P. and Platts-Mills, T.A.E. (2010) 'Allergenicity of Carbohydrates and Their Role in Anaphylactic Events', *Current Allergy and Asthma Reports*, 10(1), pp. 29–33. doi:[10.1007/s11882-009-0079-1](https://doi.org/10.1007/s11882-009-0079-1).
- Conway, M.J. *et al.* (2014) 'Mosquito saliva serine protease enhances dissemination of dengue virus into the mammalian host', *Journal of Virology*, 88(1), pp. 164–175. doi:[10.1128/JVI.02235-13](https://doi.org/10.1128/JVI.02235-13).

- Costa, C. *et al.* (1999) 'Expression of the human α :1,2-fucosyltransferase in transgenic pigs modifies the cell surface carbohydrate phenotype and confers resistance to human serum-mediated cytolysis', *The FASEB Journal*, 13(13), pp. 1762–1773. doi:[10.1096/fasebj.13.13.1762](https://doi.org/10.1096/fasebj.13.13.1762).
- Couvreur, B. *et al.* (2008) 'Variability and Action Mechanism of a Family of Anticomplement Proteins in *Ixodes ricinus*', *PLoS ONE*, 3(1), p. e1400. doi:[10.1371/journal.pone.0001400](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001400).
- Dai, J. *et al.* (2009) 'Antibodies against a tick protein, Salp15, protect mice from the Lyme disease agent', *Cell Host & Microbe*, 6(5), pp. 482–492. doi:[10.1016/j.chom.2009.10.006](https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.10.006).
- Dai, J. *et al.* (2010) 'Tick histamine release factor is critical for *Ixodes scapularis* engorgement and transmission of the lyme disease agent', *PLoS pathogens*, 6(11), p. e1001205. doi:[10.1371/journal.ppat.1001205](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001205).
- Déruaz, M. *et al.* (2008) 'Ticks produce highly selective chemokine binding proteins with antiinflammatory activity', *The Journal of Experimental Medicine*, 205(9), pp. 2019–2031. doi:[10.1084/jem.20072689](https://doi.org/10.1084/jem.20072689).
- Dinarello, C.A. (2007) 'Historical insights into cytokines', *European Journal of Immunology*, 37 Suppl 1, pp. S34–45. doi:[10.1002/eji.200737772](https://doi.org/10.1002/eji.200737772).
- Dorland, L., van Halbeek, H. and Vliegenthart, J.F.G. (1984) 'The identification of terminal α (1→3)-linked galactose in N-acetyllactosamine type of glycopeptides by means of 500-MHz ¹H-NMR spectroscopy', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 122(2), pp. 859–866. doi:[10.1016/S0006-291X\(84\)80113-8](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(84)80113-8).
- Dustin, M.L. (2014) 'The immunological synapse', *Cancer Immunology Research*, 2(11), pp. 1023–1033. doi:[10.1158/2326-6066.CIR-14-0161](https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0161).
- Ecker, M. *et al.* (no date) 'Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia', *Journal of General Virology*, 80(1), pp. 179–185. doi:[10.1099/0022-1317-80-1-179](https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-1-179).
- Eisen, R.J., Eisen, L. and Beard, C.B. (2016) 'County-Scale Distribution of *Ixodes scapularis* and *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) in the Continental United States', *Journal of Medical Entomology*, 53(2), pp. 349–386. doi:[10.1093/jme/tjv237](https://doi.org/10.1093/jme/tjv237).
- Eremeeva, M.E. and Dasch, G.A. (2015) 'Challenges posed by tick-borne rickettsiae: eco-epidemiology and public health implications', *Frontiers in Public Health*, 3, p. 55. doi:[10.3389/fpubh.2015.00055](https://doi.org/10.3389/fpubh.2015.00055).
- Estrada-Peña, A. (2015) 'Ticks as vectors: taxonomy, biology and ecology', *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)*, 34(1), pp. 53–65. doi:[10.20506/rst.34.1.2345](https://doi.org/10.20506/rst.34.1.2345).
- Falus, A. and Merétey, K. (1992) 'Histamine: an early messenger in inflammatory and immune reactions', *Immunology Today*, 13(5), pp. 154–156. doi:[10.1016/0167-5699\(92\)90117-p](https://doi.org/10.1016/0167-5699(92)90117-p).
- Fischer, J. and Biedermann, T. (2016) 'Delayed immediate-type hypersensitivity to red meat and innards: current insights into a novel disease entity', *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology: JDDG*, 14(1), pp. 38–44. doi:[10.1111/ddg.12821](https://doi.org/10.1111/ddg.12821).
- Fontaine, A. *et al.* (2011) 'Implication of haematophagous arthropod salivary proteins in host-vector interactions', *Parasites & Vectors*, 4, p. 187. doi:[10.1186/1756-3305-4-187](https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-187).
- Francischetti, I.M.B. *et al.* (2002) 'Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick, *Ixodes scapularis*: identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex', *Blood*, 99(10), pp. 3602–3612. doi:[10.1182/blood-2001-12-0237](https://doi.org/10.1182/blood-2001-12-0237).
- Galili, U. *et al.* (1987) 'Evolutionary relationship between the natural anti-Gal antibody and the Gal alpha 1----3Gal epitope in primates', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(5), pp. 1369–1373. doi:[10.1073/pnas.84.5.1369](https://doi.org/10.1073/pnas.84.5.1369).

- Galili, U *et al.* (1988) 'Man, apes, and Old World monkeys differ from other mammals in the expression of alpha-galactosyl epitopes on nucleated cells.', *Journal of Biological Chemistry*, 263(33), pp. 17755–17762. doi:[10.1016/S0021-9258\(19\)77900-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)77900-9).
- Galili, Uri (1993) 'Interaction of the natural anti-Gal antibody with α -galactosyl epitopes: a major obstacle for xenotransplantation in humans', *Immunology Today*, 14(10), pp. 480–482. doi:[10.1016/0167-5699\(93\)90261-I](https://doi.org/10.1016/0167-5699(93)90261-I).
- Galili, U. (2015) 'Acceleration of wound healing by α -gal nanoparticles interacting with the natural anti-Gal antibody', *Journal of Immunology Research*, 2015, p. 589648. doi:[10.1155/2015/589648](https://doi.org/10.1155/2015/589648).
- Galili, U. (2013) 'Anti-Gal: an abundant human natural antibody of multiple pathogenesis and clinical benefits', *Immunology*, 140(1), pp. 1–11. doi:[10.1111/imm.12110](https://doi.org/10.1111/imm.12110).
- Galili, U., LaTemple, D.C. and Radic, M.Z. (1998) 'A sensitive assay for measuring alpha-Gal epitope expression on cells by a monoclonal anti-Gal antibody', *Transplantation*, 65(8), pp. 1129–1132. doi:[10.1097/00007890-199804270-00020](https://doi.org/10.1097/00007890-199804270-00020).
- Galili, U. and Swanson, K. (1991) 'Gene sequences suggest inactivation of alpha-1,3-galactosyltransferase in catarrhines after the divergence of apes from monkeys', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(16), pp. 7401–7404. doi:[10.1073/pnas.88.16.7401](https://doi.org/10.1073/pnas.88.16.7401).
- Galli, S.J. (2000) 'Mast cells and basophils', *Current Opinion in Hematology*, 7(1), pp. 32–39. doi:[10.1097/00062752-200001000-00007](https://doi.org/10.1097/00062752-200001000-00007).
- Gastinel, L.N. *et al.* (2001) 'Bovine α 1,3-galactosyltransferase catalytic domain structure and its relationship with ABO histo-blood group and glycosphingolipid glycosyltransferases', *The EMBO Journal*, 20(4), pp. 638–649. doi:[10.1093/emboj/20.4.638](https://doi.org/10.1093/emboj/20.4.638).
- Gern, L. and Rais, O. (1996) 'Efficient transmission of *Borrelia burgdorferi* between co-feeding *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae)', *Journal of Medical Entomology*, 33(1), pp. 189–192. doi:[10.1093/jmedent/33.1.189](https://doi.org/10.1093/jmedent/33.1.189).
- Gillespie, R.D. *et al.* (2001) 'Identification of an IL-2 Binding Protein in the Saliva of the Lyme Disease Vector Tick, *Ixodes scapularis*', *The Journal of Immunology*, 166(7), pp. 4319–4326. doi:[10.4049/jimmunol.166.7.4319](https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.7.4319).
- Glatz, M. *et al.* (2017) 'Characterization of the early local immune response to *Ixodes ricinus* tick bites in human skin', *Experimental Dermatology*, 26(3), pp. 263–269. doi:[10.1111/exd.13207](https://doi.org/10.1111/exd.13207).
- Hackenberg, M. and Kotsyfakis, M. (2018) 'Exosome-Mediated Pathogen Transmission by Arthropod Vectors', *Trends in Parasitology*, 34(7), pp. 549–552. doi:[10.1016/j.pt.2018.04.001](https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.04.001).
- Hajnická, V. *et al.* (2000) 'Inhibition of the antiviral action of interferon by tick salivary gland extract', *Parasite Immunology*, 22(4), pp. 201–206. doi:[10.1046/j.1365-3024.2000.00296.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.2000.00296.x).
- Hamsten, C. *et al.* (2013) 'Identification of galactose- α -1,3-galactose in the gastrointestinal tract of the tick *Ixodes ricinus*; possible relationship with red meat allergy', *Allergy*, 68(4), pp. 549–552. doi:[10.1111/all.12128](https://doi.org/10.1111/all.12128).
- Han, W. *et al.* (2012) 'The wciN gene encodes an α -1,3-galactosyltransferase involved in the biosynthesis of the capsule repeating unit of *Streptococcus pneumoniae* serotype', *Biochemistry*, 51(29), pp. 5804–5810. doi:[10.1021/bi300640b](https://doi.org/10.1021/bi300640b).
- Hannier, S. *et al.* (2003) '*Ixodes ricinus* tick salivary gland extract inhibits IL-10 secretion and CD69 expression by mitogen-stimulated murine splenocytes and induces hyporesponsiveness in B lymphocytes', *Parasite Immunology*, 25(1), pp. 27–37. doi:[10.1046/j.1365-3024.2003.00605.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.2003.00605.x).

- Hannier, S. *et al.* (2004) 'Characterization of the B-cell inhibitory protein factor in *Ixodes ricinus* tick saliva: a potential role in enhanced *Borrelia burgdorferi* transmission', *Immunology*, 113(3), pp. 401–408. doi:[10.1111/j.1365-2567.2004.01975.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.01975.x).
- Hartemink, N.A. *et al.* (2008) 'The Basic Reproduction Number for Complex Disease Systems: Defining R0 for Tick-Borne Infections.', *The American Naturalist*, 171(6), pp. 743–754. doi:[10.1086/587530](https://doi.org/10.1086/587530).
- He, P.G., Hu, J. and Macher, B.A. (1993) 'Glycosphingolipids of Rabbit, Sheep, and Pig Thymus', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 305(2), pp. 350–361. doi:[10.1006/abbi.1993.1432](https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1432).
- Hellwege, J. *et al.* (2001) 'The complement regulator factor H binds to the surface protein OspE of *Borrelia burgdorferi*', *The Journal of Biological Chemistry*, 276(11), pp. 8427–8435. doi:[10.1074/jbc.M007994200](https://doi.org/10.1074/jbc.M007994200).
- Hendricks, S.P. *et al.* (1990) 'Regulation of the expression of Gal alpha 1-3Gal beta 1-4GlcNAc glycosphingolipids in kidney.', *Journal of Biological Chemistry*, 265(29), pp. 17621–17626. doi:[10.1016/S0021-9258\(18\)38209-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)38209-7).
- Henion, T.R. *et al.* (1997) 'Synthesis of alpha-gal epitopes on influenza virus vaccines, by recombinant alpha 1,3galactosyltransferase, enables the formation of immune complexes with the natural anti-Gal antibody', *Vaccine*, 15(11), pp. 1174–1182. doi:[10.1016/s0264-410x\(96\)00300-3](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(96)00300-3).
- Hennet, T. (2002) 'The galactosyltransferase family', *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 59(7), pp. 1081–1095. doi:[10.1007/s00018-002-8489-4](https://doi.org/10.1007/s00018-002-8489-4).
- Hermance, M.E. and Thangamani, S. (2015) 'Tick Saliva Enhances Powassan Virus Transmission to the Host, Influencing Its Dissemination and the Course of Disease', *Journal of Virology*, 89(15), pp. 7852–7860. doi:[10.1128/JVI.01056-15](https://doi.org/10.1128/JVI.01056-15).
- Holmskov, U., Thiel, S. and Jensenius, J.C. (2003) 'Collections and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense', *Annual Review of Immunology*, 21, pp. 547–578. doi:[10.1146/annurev.immunol.21.120601.140954](https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.140954).
- Hovius, J.W. *et al.* (2008) 'Preferential protection of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto by a Salp15 homologue in *Ixodes ricinus* saliva', *The Journal of Infectious Diseases*, 198(8), pp. 1189–1197. doi:[10.1086/591917](https://doi.org/10.1086/591917).
- Hovius, J.W.R. *et al.* (2007) 'Identification of Salp15 homologues in *Ixodes ricinus* ticks', *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*, 7(3), pp. 296–303. doi:[10.1089/vbz.2006.0624](https://doi.org/10.1089/vbz.2006.0624).
- Hovius, J.W.R. (2009) 'Spitting image: tick saliva assists the causative agent of Lyme disease in evading host skin's innate immune response', *The Journal of Investigative Dermatology*, 129(10), pp. 2337–2339. doi:[10.1038/jid.2009.202](https://doi.org/10.1038/jid.2009.202).
- Huai, G. *et al.* (2016) 'Characteristics of α -Gal epitope, anti-Gal antibody, α 1,3 galactosyltransferase and its clinical exploitation (Review)', *International Journal of Molecular Medicine*, 37(1), pp. 11–20. doi:[10.3892/ijmm.2015.2397](https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2397).
- Chaplin, D.D. (2010) 'Overview of the immune response', *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2 Suppl 2), pp. S3-23. doi:[10.1016/j.jaci.2009.12.980](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.12.980).
- Ibrahim, M.A. *et al.* (2001) 'Factor Xa (FXa) inhibitor from the nymphs of the camel tick *Hyalomma dromedarii*', *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 130(4), pp. 501–512. doi:[10.1016/s1096-4959\(01\)00459-6](https://doi.org/10.1016/s1096-4959(01)00459-6).
- Islam, M.S. and You, M.-J. (2018) 'Expression Patterns of Host Inflammatory Cytokine Genes during Infestation with *Haemaphysalis longicornis*, a Zoonotic Vector, in Blood Sucking Periods', *The Korean Journal of Parasitology*, 56(1), pp. 53–59. doi:[10.3347/kjp.2018.56.1.53](https://doi.org/10.3347/kjp.2018.56.1.53).
- Iwasaki, A. and Medzhitov, R. (2015) 'Control of adaptive immunity by the innate immune system', *Nature Immunology*, 16(4), pp. 343–353. doi:[10.1038/ni.3123](https://doi.org/10.1038/ni.3123).

- Jacquet, S., Moneret-Vautrin, D.-A. and Bihain, B.E. (2009) 'Mammalian meat-induced anaphylaxis: Clinical relevance of anti-galactose- α -1,3-galactose IgE confirmed by means of skin tests to cetuximab', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 124(3), pp. 603–605. doi:[10.1016/j.jaci.2009.06.014](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.06.014).
- Jennings, M.P. *et al.* (1998) 'Identification of a novel gene involved in pilin glycosylation in *Neisseria meningitidis*', *Molecular Microbiology*, 29(4), pp. 975–984. doi:[10.1046/j.1365-2958.1998.00962.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00962.x).
- Jin, L. *et al.* (2018) 'Salivary factor LTRIN from *Aedes aegypti* facilitates the transmission of Zika virus by interfering with the lymphotoxin- β receptor', *Nature Immunology*, 19(4), pp. 342–353. doi:[10.1038/s41590-018-0063-9](https://doi.org/10.1038/s41590-018-0063-9).
- Jones, L.D., Hodgson, E. and Nuttall, P.A. (1989) 'Enhancement of virus transmission by tick salivary glands', *The Journal of General Virology*, 70 (Pt 7), pp. 1895–1898. doi:[10.1099/0022-1317-70-7-1895](https://doi.org/10.1099/0022-1317-70-7-1895).
- Jones, L.D., Hodgson, E. and Nuttall, P.A. (1991) 'Characterization of tick salivary gland factor(s) that enhance Thogoto virus transmission', in Calisher, C.H. (ed.) *Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome, Tick- and Mosquito-Borne Viruses*. Vienna: Springer (Archives of Virology Supplementum), pp. 227–234. doi:[10.1007/978-3-7091-9091-3_25](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-9091-3_25).
- Joshi, N.S. and Kaech, S.M. (2008) 'Effector CD8 T cell development: a balancing act between memory cell potential and terminal differentiation', *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 180(3), pp. 1309–1315. doi:[10.4049/jimmunol.180.3.1309](https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.3.1309).
- Joziase, D.H. *et al.* (1991) 'Characterization of an alpha 1—3-galactosyltransferase homologue on human chromosome 12 that is organized as a processed pseudogene.', *Journal of Biological Chemistry*, 266(11), pp. 6991–6998. doi:[10.1016/S0021-9258\(20\)89600-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)89600-8).
- Juncadella, I.J. and Anguita, J. (2009) 'The immunosuppressive tick salivary protein, Salp15', *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 666, pp. 121–131. doi:[10.1007/978-1-4419-1601-3_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1601-3_10).
- Karasuyama, H., Miyake, K. and Yoshikawa, S. (2020) 'Immunobiology of Acquired Resistance to Ticks', *Frontiers in Immunology*, 0. doi:[10.3389/fimmu.2020.601504](https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.601504).
- Kazimírová, M. and Štibrániová, I. (2013) 'Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3, p. 43. doi:[10.3389/fcimb.2013.00043](https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00043).
- Keil, W. *et al.* (1985) 'Carbohydrates of influenza virus. Structural elucidation of the individual glycans of the FPV hemagglutinin by two-dimensional 1H n.m.r. and methylation analysis', *The EMBO journal*, 4(10), pp. 2711–2720.
- Keller, P.M. *et al.* (1993) 'Cloning of the cDNA and expression of moubatin, an inhibitor of platelet aggregation.', *Journal of Biological Chemistry*, 268(8), pp. 5450–5456. doi:[10.1016/S0021-9258\(18\)53342-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)53342-1).
- Kemp, D.H., Stone, B.F. and Binnington, K.C. (1982) 'CHAPTER 4 - Tick Attachment and Feeding: Role of the Mouthparts, Feeding Apparatus, Salivary Gland Secretions and the Host Response', in Obenchain, F.D. and Galun, R. (eds) *Physiology of Ticks*. Pergamon, pp. 119–168. doi:[10.1016/B978-0-08-024937-7.50009-3](https://doi.org/10.1016/B978-0-08-024937-7.50009-3).
- Khan, B.Q. and Kemp, S.F. (2011) 'Pathophysiology of anaphylaxis', *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 11(4), pp. 319–325. doi:[10.1097/ACI.0b013e3283481ab6](https://doi.org/10.1097/ACI.0b013e3283481ab6).
- Kjaer, T.R. *et al.* (2015) 'Structural insights into the initiating complex of the lectin pathway of complement activation', *Structure (London, England: 1993)*, 23(2), pp. 342–351. doi:[10.1016/j.str.2014.10.024](https://doi.org/10.1016/j.str.2014.10.024).

- Kotsyfakis, M. *et al.* (2006) 'Antiinflammatory and Immunosuppressive Activity of Sialostatin L, a Salivary Cystatin from the Tick *Ixodes scapularis**', *Journal of Biological Chemistry*, 281(36), pp. 26298–26307. doi:[10.1074/jbc.M513010200](https://doi.org/10.1074/jbc.M513010200).
- Koudstaal, D., Kemp, D.H. and Kerr, J.D. (1978) 'Boophilus microplus: rejection of larvae from British breed cattle', *Parasitology*, 76(3), pp. 379–386. doi:[10.1017/s0031182000048241](https://doi.org/10.1017/s0031182000048241).
- Krivan, H.C. *et al.* (1986) 'Cell surface binding site for *Clostridium difficile* enterotoxin: evidence for a glycoconjugate containing the sequence Gal alpha 1-3Gal beta 1-4GlcNAc', *Infection and Immunity*, 53(3), pp. 573–581. doi:[10.1128/iai.53.3.573-581.1986](https://doi.org/10.1128/iai.53.3.573-581.1986).
- Kuthejlová, M. *et al.* (2001) 'Tick salivary gland extract inhibits killing of *Borrelia afzelii* spirochetes by mouse macrophages', *Infection and Immunity*, 69(1), pp. 575–578. doi:[10.1128/IAI.69.1.575-578.2001](https://doi.org/10.1128/IAI.69.1.575-578.2001).
- Kwon, D.-J. *et al.* (2017) 'Generation of α -1,3-galactosyltransferase knocked-out transgenic cloned pigs with knocked-in five human genes', *Transgenic Research*, 26(1), pp. 153–163. doi:[10.1007/s11248-016-9979-8](https://doi.org/10.1007/s11248-016-9979-8).
- Labuda, M., Jones, L.D., *et al.* (1993) 'Enhancement of tick-borne encephalitis virus transmission by tick salivary gland extracts', *Medical and Veterinary Entomology*, 7(2), pp. 193–196. doi:[10.1111/j.1365-2915.1993.tb00674.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1993.tb00674.x).
- Labuda, M., Nuttall, P.A., *et al.* (1993) 'Non-viraemic transmission of tick-borne encephalitis virus: a mechanism for arbovirus survival in nature', *Experientia*, 49(9), pp. 802–805. doi:[10.1007/BF01923553](https://doi.org/10.1007/BF01923553).
- Leboulle, G. *et al.* (2002) 'Characterization of a Novel Salivary Immunosuppressive Protein from *Ixodes ricinus* Ticks *', *Journal of Biological Chemistry*, 277(12), pp. 10083–10089. doi:[10.1074/jbc.M111391200](https://doi.org/10.1074/jbc.M111391200).
- Lee, K.W. and Lip, G.Y.H. (2003) 'Effects of lifestyle on hemostasis, fibrinolysis, and platelet reactivity: a systematic review', *Archives of Internal Medicine*, 163(19), pp. 2368–2392. doi:[10.1001/archinte.163.19.2368](https://doi.org/10.1001/archinte.163.19.2368).
- Leonard, C.K. *et al.* (1990) 'Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells', *The Journal of Biological Chemistry*, 265(18), pp. 10373–10382.
- Levin, M. *et al.* (2019) 'Galactose α -1,3-galactose phenotypes: Lessons from various patient populations', *Annals of Allergy, Asthma & Immunology: Official Publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*, 122(6), pp. 598–602. doi:[10.1016/j.anai.2019.03.021](https://doi.org/10.1016/j.anai.2019.03.021).
- Lombard, V. *et al.* (2014) 'The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013', *Nucleic Acids Research*, 42(Database issue), pp. D490–495. doi:[10.1093/nar/gkt1178](https://doi.org/10.1093/nar/gkt1178).
- Macháčková, M., Oborník, M. and Kopecký, J. (2013) 'Effect of salivary gland extract from *Ixodes ricinus* ticks on the proliferation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto in vivo', *Folia Parasitologica*, 53(2), pp. 153–158. doi:[10.14411/fp.2006.020](https://doi.org/10.14411/fp.2006.020).
- Macher, B.A. and Galili, U. (2008) 'The Gal α 1,3Gal β 1,4GlcNAc-R (α -Gal) epitope: A carbohydrate of unique evolution and clinical relevance', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1780(2), pp. 75–88. doi:[10.1016/j.bbagen.2007.11.003](https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2007.11.003).
- Masters, E.J., Grigery, C.N. and Masters, R.W. (2008) 'STARI, or Masters disease: Lone Star tick-vectored Lyme-like illness', *Infectious Disease Clinics of North America*, 22(2), pp. 361–376, viii. doi:[10.1016/j.idc.2007.12.010](https://doi.org/10.1016/j.idc.2007.12.010).
- Matar, P. *et al.* (2004) 'Combined epidermal growth factor receptor targeting with the tyrosine kinase inhibitor gefitinib (ZD1839) and the monoclonal antibody cetuximab (IMC-C225): superiority over single-agent receptor targeting', *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 10(19), pp. 6487–6501. doi:[10.1158/1078-0432.CCR-04-0870](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0870).

- Mateos-Hernández, L. *et al.* (2017) 'Tick-host conflict: immunoglobulin E antibodies to tick proteins in patients with anaphylaxis to tick bite', *Oncotarget*, 8(13), pp. 20630–20644. doi:[10.18632/oncotarget.15243](https://doi.org/10.18632/oncotarget.15243).
- Matsuda, H. *et al.* (1985) 'Inability of genetically mast cell-deficient W/W^v mice to acquire resistance against larval *Haemaphysalis longicornis* ticks', *The Journal of Parasitology*, 71(4), pp. 443–448.
- McEver, R.P. (2001) 'Adhesive Interactions of Leukocytes, Platelets, and the Vessel Wall during Hemostasis and Inflammation', *Thrombosis and Haemostasis*, 86(9), pp. 746–756. doi:[10.1055/s-0037-1616128](https://doi.org/10.1055/s-0037-1616128).
- Mckay, W.J.S. (1940) 'Tick Bite and Allergy.', *Medical Journal of Australia*, 1(13). Available at: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19402901670> (Accessed: 17 February 2022).
- Miyagawa, S. *et al.* (2001) 'Remodeling of the major pig xenoantigen by N-acetylglucosaminyltransferase III in transgenic pig', *The Journal of Biological Chemistry*, 276(42), pp. 39310–39319. doi:[10.1074/jbc.M104359200](https://doi.org/10.1074/jbc.M104359200).
- Montassier, E. *et al.* (2020) 'Distribution of Bacterial α 1,3-Galactosyltransferase Genes in the Human Gut Microbiome', *Frontiers in Immunology*, 10, p. 3000. doi:[10.3389/fimmu.2019.03000](https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03000).
- Naeimi Kararoudi, Meisam *et al.* (2018) 'Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas9 Gene Editing Technique in Xenotransplantation', *Frontiers in Immunology*, 9, p. 1711. doi:[10.3389/fimmu.2018.01711](https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01711).
- Nakahigashi, K. *et al.* (2013) 'Evaluation of basophil infiltration into the skin lesions of tick bites', *Case Reports in Dermatology*, 5(1), pp. 48–51. doi:[10.1159/000348650](https://doi.org/10.1159/000348650).
- Narasimhan, S. *et al.* (2019) 'Host-specific expression of *Ixodes scapularis* salivary genes', *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 10(2), pp. 386–397. doi:[10.1016/j.ttbdis.2018.12.001](https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.12.001).
- Nazario, S. *et al.* (1998) 'Prevention of *Borrelia burgdorferi* transmission in guinea pigs by tick immunity', *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 58(6), pp. 780–785. doi:[10.4269/ajtmh.1998.58.780](https://doi.org/10.4269/ajtmh.1998.58.780).
- Nestle, F.O. *et al.* (2009) 'Skin immune sentinels in health and disease', *Nature Reviews. Immunology*, 9(10), pp. 679–691. doi:[10.1038/nri2622](https://doi.org/10.1038/nri2622).
- Núñez, R. *et al.* (2011) 'Delayed mammalian meat-induced anaphylaxis due to galactose- α -1,3-galactose in 5 European patients', *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 128(5), pp. 1122–1124.e1. doi:[10.1016/j.jaci.2011.07.020](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.07.020).
- Nunn, M.A. *et al.* (2005) 'Complement inhibitor of C5 activation from the soft tick *Ornithodoros moubata*', *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 174(4), pp. 2084–2091. doi:[10.4049/jimmunol.174.4.2084](https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.4.2084).
- Nuttall, P.A. (2019) 'Tick saliva and its role in pathogen transmission', *Wiener Klinische Wochenschrift* [Preprint]. doi:[10.1007/s00508-019-1500-y](https://doi.org/10.1007/s00508-019-1500-y).
- Nuttall, P.A. (2019b) 'Wonders of tick saliva', *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 10(2), pp. 470–481. doi:[10.1016/j.ttbdis.2018.11.005](https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.11.005).
- Ohsawa, Y. and Hirasawa, N. (2014) 'The role of histamine H1 and H4 receptors in atopic dermatitis: from basic research to clinical study', *Allergology International: Official Journal of the Japanese Society of Allergology*, 63(4), pp. 533–542. doi:[10.2332/allergolint.13-RA-0675](https://doi.org/10.2332/allergolint.13-RA-0675).
- Ohta, T. *et al.* (2017) 'Skin CD4⁺ Memory T Cells Play an Essential Role in Acquired Anti-Tick Immunity through Interleukin-3-Mediated Basophil Recruitment to Tick-Feeding Sites', *Frontiers in Immunology*, 8, p. 1348. doi:[10.3389/fimmu.2017.01348](https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01348).
- Oliveira, C.J.F. *et al.* (2008) 'Tick saliva inhibits the chemotactic function of MIP-1 α and selectively impairs chemotaxis of immature dendritic cells by down-regulating cell-surface CCR5', *International Journal for Parasitology*, 38(6), pp. 705–716. doi:[10.1016/j.ijpara.2007.10.006](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.10.006).

Oliveira, C.J.F. *et al.* (2010) 'Tick saliva induces regulatory dendritic cells: MAP-kinases and Toll-like receptor-2 expression as potential targets', *Veterinary Parasitology*, 167(2–4), pp. 288–297. doi:[10.1016/j.vetpar.2009.09.031](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.031).

O'Neil, B.H. *et al.* (2007) 'High Incidence of Cetuximab-Related Infusion Reactions in Tennessee and North Carolina and the Association With Atopic History', *Journal of Clinical Oncology*, 25(24), pp. 3644–3648. doi:[10.1200/JCO.2007.11.7812](https://doi.org/10.1200/JCO.2007.11.7812).

Patel, D. *et al.* (2010) 'IgG isotype, glycosylation, and EGFR expression determine the induction of antibody-dependent cellular cytotoxicity in vitro by cetuximab', *Human Antibodies*, 19(4), pp. 89–99. doi:[10.3233/HAB-2010-0232](https://doi.org/10.3233/HAB-2010-0232).

Pechová, J., Kopecký, J. and Salát, J. (2004) 'Effect of tick salivary gland extract on the cytokine production by mouse epidermal cells', *Folia Parasitologica*, 51(4), pp. 367–372.

Penka, Miroslav a Eva Slavíčková. *Hematologie a transfuzní lékařství*. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3459-9.

Pestka, S. *et al.* (2004) 'Interleukin-10 and related cytokines and receptors', *Annual Review of Immunology*, 22, pp. 929–979. doi:[10.1146/annurev.immunol.22.012703.104622](https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104622).

Porter, C.J.H., Trevaskis, N.L. and Charman, W.N. (2007) 'Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs', *Nature Reviews. Drug Discovery*, 6(3), pp. 231–248. doi:[10.1038/nrd2197](https://doi.org/10.1038/nrd2197).

Preston, S.G. *et al.* (2013) 'Novel immunomodulators from hard ticks selectively reprogramme human dendritic cell responses', *PLoS pathogens*, 9(6), p. e1003450. doi:[10.1371/journal.ppat.1003450](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003450).

Prevot, P.-P. *et al.* (2009) 'Exosites mediate the anti-inflammatory effects of a multifunctional serpin from the saliva of the tick *Ixodes ricinus*', *The FEBS journal*, 276(12), pp. 3235–3246. doi:[10.1111/j.1742-4658.2009.07038.x](https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07038.x).

Ramasamy, R. and Field, M.C. (2012) 'Terminal galactosylation of glycoconjugates in *Plasmodium falciparum* asexual blood stages and *Trypanosoma brucei* bloodstream trypomastigotes', *Experimental Parasitology*, 130(4), pp. 314–320. doi:[10.1016/j.exppara.2012.02.017](https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.02.017).

Repik, P.M., Strizki, J.M. and Galili, U. (1994) 'Differential host-dependent expression of α -galactosyl epitopes on viral glycoproteins: a study of eastern equine encephalitis virus as a model', *Journal of General Virology*, 75(5), pp. 1177–1181. doi:[10.1099/0022-1317-75-5-1177](https://doi.org/10.1099/0022-1317-75-5-1177).

Rossi, G.R. *et al.* (2005) 'Effective treatment of preexisting melanoma with whole cell vaccines expressing alpha(1,3)-galactosyl epitopes', *Cancer Research*, 65(22), pp. 10555–10561. doi:[10.1158/0008-5472.CAN-05-0627](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0627).

Saleh, H. *et al.* (2012) 'Anaphylactic Reactions to Oligosaccharides in Red Meat: A Syndrome in Evolution', *Clinical and molecular allergy : CMA*, 10, p. 5. doi:[10.1186/1476-7961-10-5](https://doi.org/10.1186/1476-7961-10-5).

Sangamnatdej, S. *et al.* (2002) 'A high affinity serotonin- and histamine-binding lipocalin from tick saliva', *Insect Molecular Biology*, 11(1), pp. 79–86. doi:[10.1046/j.0962-1075.2001.00311.x](https://doi.org/10.1046/j.0962-1075.2001.00311.x).

Sá-Nunes, A. *et al.* (2007) 'Prostaglandin E2 Is a Major Inhibitor of Dendritic Cell Maturation and Function in *Ixodes scapularis* Saliva', *The Journal of Immunology*, 179(3), pp. 1497–1505. doi:[10.4049/jimmunol.179.3.1497](https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.3.1497).

Schlessinger, J. (2000) 'Cell signaling by receptor tyrosine kinases', *Cell*, 103(2), pp. 211–225. doi:[10.1016/s0092-8674\(00\)00114-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00114-8).

Schneider, P. *et al.* (1994) 'Glycoinositol-phospholipid profiles of four serotypically distinct Old World *Leishmania* strains', *The Biochemical Journal*, 304 (Pt 2), pp. 603–609. doi:[10.1042/bj3040603](https://doi.org/10.1042/bj3040603).

- Schoeler, G.B. and Wikel, S.K. (2001) 'Modulation of host immunity by haematophagous arthropods', *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 95(8), pp. 755–771. doi:[10.1080/0003498012011118](https://doi.org/10.1080/0003498012011118).
- Schuijt, T.J. *et al.* (2011) 'A tick mannose-binding lectin inhibitor interferes with the vertebrate complement cascade to enhance transmission of the Lyme disease agent', *Cell Host & Microbe*, 10(2), pp. 136–146. doi:[10.1016/j.chom.2011.06.010](https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.06.010).
- Shaw, M.K., Tilney, L.G. and McKeever, D.J. (1993) 'Tick salivary gland extract and interleukin-2 stimulation enhance susceptibility of lymphocytes to infection by *Theileria parva* sporozoites', *Infection and Immunity*, 61(4), pp. 1486–1495. doi:[10.1128/iai.61.4.1486-1495.1993](https://doi.org/10.1128/iai.61.4.1486-1495.1993).
- Singh, S.K. and Girschick, H.J. (2004) 'Molecular survival strategies of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*', *The Lancet. Infectious Diseases*, 4(9), pp. 575–583. doi:[10.1016/S1473-3099\(04\)01132-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(04)01132-6).
- Slámová, M. *et al.* (2011) 'Effect of tick saliva on immune interactions between *Borrelia afzelii* and murine dendritic cells', *Parasite Immunology*, 33(12), pp. 654–660. doi:[10.1111/j.1365-3024.2011.01332.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2011.01332.x).
- Smith, K.A. (1992) 'Interleukin-2', *Current Opinion in Immunology*, 4(3), pp. 271–276. doi:[10.1016/0952-7915\(92\)90076-Q](https://doi.org/10.1016/0952-7915(92)90076-Q).
- Soares, M.P. and Yilmaz, B. (2016) 'Microbiota Control of Malaria Transmission', *Trends in Parasitology*, 32(2), pp. 120–130. doi:[10.1016/j.pt.2015.11.004](https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.11.004).
- Sonenshine, Daniel E. a R. Michael ROE. *Biology of ticks*. 2nd ed. New York: Oxford University Press, 2014. ISBN 978-0-19-974405-3
- Souto-Padron, T. *et al.* (1994) 'Distribution of alpha-galactosyl-containing epitopes on *Trypanosoma cruzi* trypomastigote and amastigote forms from infected Vero cells detected by Chagasic antibodies', *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 41(1), pp. 47–54. doi:[10.1111/j.1550-7408.1994.tb05933.x](https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1994.tb05933.x).
- Spiro, R.G. and Bhooyroo, V.D. (1984) 'Occurrence of alpha-D-galactosyl residues in the thyroglobulins from several species. Localization in the saccharide chains of the complex carbohydrate units.', *Journal of Biological Chemistry*, 259(15), pp. 9858–9866. doi:[10.1016/S0021-9258\(17\)42779-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)42779-7).
- Steen, N.A., Barker, S.C. and Alewood, P.F. (2006) 'Proteins in the saliva of the Ixodida (ticks): pharmacological features and biological significance', *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 47(1), pp. 1–20. doi:[10.1016/j.toxicon.2005.09.010](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.09.010).
- Steinke, J.W., Platts-Mills, T.A.E. and Commins, S.P. (2015) 'The alpha-gal story: lessons learned from connecting the dots', *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 135(3), pp. 589–596; quiz 597. doi:[10.1016/j.jaci.2014.12.1947](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.12.1947).
- Stone, K.D., Prussin, C. and Metcalfe, D.D. (2010) 'IgE, mast cells, basophils, and eosinophils', *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2 Suppl 2), pp. S73-80. doi:[10.1016/j.jaci.2009.11.017](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.11.017).
- Suppan, J. *et al.* (2018) 'Tick attachment cement – reviewing the mysteries of a biological skin plug system', *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 93(2), pp. 1056–1076. doi:[10.1111/brv.12384](https://doi.org/10.1111/brv.12384).
- Šlechtová J., Hemostáza – jak ji možná neznáme. *Klin. Biochem. Metab.*, 15(36), 2007, No.2, p. 97-101.
- Tanemura, M. *et al.* (1998) 'Reduction of the major swine xenoantigen, the alpha-galactosyl epitope by transfection of the alpha2,3-sialyltransferase gene', *The Journal of Biological Chemistry*, 273(26), pp. 16421–16425. doi:[10.1074/jbc.273.26.16421](https://doi.org/10.1074/jbc.273.26.16421).
- Thall, A. and Galili, U. (1990) 'Distribution of Gal alpha 1----3Gal beta 1----4GlcNAc residues on secreted mammalian glycoproteins (thyroglobulin, fibrinogen, and immunoglobulin G) as measured by a sensitive solid-phase radioimmunoassay', *Biochemistry*, 29(16), pp. 3959–3965. doi:[10.1021/bi00468a024](https://doi.org/10.1021/bi00468a024).

- Thall, A.D., Malý, P. and Lowe, J.B. (1995) 'Oocyte Gal alpha 1,3Gal epitopes implicated in sperm adhesion to the zona pellucida glycoprotein ZP3 are not required for fertilization in the mouse', *The Journal of Biological Chemistry*, 270(37), pp. 21437–21440. doi:[10.1074/jbc.270.37.21437](https://doi.org/10.1074/jbc.270.37.21437).
- Towbin, H. *et al.* (1987) 'Circulating antibodies to mouse laminin in Chagas disease, American cutaneous leishmaniasis, and normal individuals recognize terminal galactosyl(alpha 1-3)-galactose epitopes', *The Journal of Experimental Medicine*, 166(2), pp. 419–432. doi:[10.1084/jem.166.2.419](https://doi.org/10.1084/jem.166.2.419).
- Tyson, K. *et al.* (2007) 'Biochemical and functional characterization of Salp20, an Ixodes scapularis tick salivary protein that inhibits the complement pathway', *Insect Molecular Biology*, 16(4), pp. 469–479. doi:[10.1111/j.1365-2583.2007.00742.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2007.00742.x).
- Valenzuela, J.G. *et al.* (2000) 'Purification, Cloning, and Expression of a Novel Salivary Anticomplement Protein from the Tick, *Ixodes scapularis* *', *Journal of Biological Chemistry*, 275(25), pp. 18717–18723. doi:[10.1074/jbc.M001486200](https://doi.org/10.1074/jbc.M001486200).
- Valenzuela, J.G. *et al.* (2002) 'Exploring the sialome of the tick *Ixodes scapularis*', *Journal of Experimental Biology*, 205(18), pp. 2843–2864. doi:[10.1242/jeb.205.18.2843](https://doi.org/10.1242/jeb.205.18.2843).
- Van Nunen, S.A. *et al.* (2009) 'An association between tick bite reactions and red meat allergy in humans', *The Medical Journal of Australia*, 190(9), pp. 510–511. doi:[10.5694/j.1326-5377.2009.tb02533.x](https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.2009.tb02533.x).
- Van Wye, J.E. *et al.* (1991) 'Anaphylaxis from a tick bite', *The New England Journal of Medicine*, 324(11), pp. 777–778.
- Vančová, I. *et al.* (2007) 'Differential anti-chemokine activity of *Amblyomma variegatum* adult ticks during blood-feeding', *Parasite Immunology*, 29(4), pp. 169–177. doi:[10.1111/j.1365-3024.2006.00931.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2006.00931.x).
- Volf, Petr, Petr Horák, Ivan Čepička, Jaroslav Flegr, Julius Lukeš, Libor Mikeš, Milena Svobodová, Jiří Vávra a Jan Votýpka. *Paraziti a jejich biologie*. Praha: TRITON, 2007, 318 s. ISBN 978-80-7387-008-9.
- Wada, T. *et al.* (2010) 'Selective ablation of basophils in mice reveals their nonredundant role in acquired immunity against ticks', *The Journal of Clinical Investigation*, 120(8), pp. 2867–2875. doi:[10.1172/JCI42680](https://doi.org/10.1172/JCI42680).
- Welsh, R.M. *et al.* (1998) 'Evaluation of the Galalpha 1-3Gal epitope as a host modification factor eliciting natural humoral immunity to enveloped viruses', *Journal of Virology*, 72(6), pp. 4650–4656. doi:[10.1128/JVI.72.6.4650-4656.1998](https://doi.org/10.1128/JVI.72.6.4650-4656.1998).
- Whalen, G.F. *et al.* (2012) 'Cancer immunotherapy by intratumoral injection of α -gal glycolipids', *Anticancer Research*, 32(9), pp. 3861–3868.
- Wikel, S. (2013) 'Ticks and tick-borne pathogens at the cutaneous interface: host defenses, tick countermeasures, and a suitable environment for pathogen establishment', *Frontiers in Microbiology*, 4, p. 337. doi:[10.3389/fmicb.2013.00337](https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00337).
- Wikel, S.K. (1996) 'Host immunity to ticks', *Annual Review of Entomology*, 41, pp. 1–22. doi:[10.1146/annurev.en.41.010196.000245](https://doi.org/10.1146/annurev.en.41.010196.000245).
- Wikel, S.K. and Bergman, D. (1997) 'Tick-host immunology: Significant advances and challenging opportunities', *Parasitology Today*, 13(10), pp. 383–389. doi:[10.1016/S0169-4758\(97\)01126-5](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(97)01126-5).
- Winand, R.J. *et al.* (1993) 'Xenogeneic thyroid-stimulating hormone-like activity of the human natural anti-Gal antibody. Interaction of anti-Gal with porcine thyrocytes and with recombinant human thyroid-stimulating hormone receptors expressed on mouse cells', *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 151(7), pp. 3923–3934.

Wu, J. *et al.* (2010) 'Two immunoregulatory peptides with antioxidant activity from tick salivary glands', *The Journal of Biological Chemistry*, 285(22), pp. 16606–16613. doi:[10.1074/jbc.M109.094615](https://doi.org/10.1074/jbc.M109.094615).

Yilmaz, B. *et al.* (2014) 'Gut microbiota elicits a protective immune response against malaria transmission', *Cell*, 159(6), pp. 1277–1289. doi:[10.1016/j.cell.2014.10.053](https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.053).

Yin, D. *et al.* (2004) 'Cutting Edge: NK cells mediate IgG1-dependent hyperacute rejection of xenografts', *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 172(12), pp. 7235–7238. doi:[10.4049/jimmunol.172.12.7235](https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.12.7235).

Zeidner, N.S. *et al.* (2002) 'Coinoculation of *Borrelia* spp. with tick salivary gland lysate enhances spirochete load in mice and is tick species-specific', *The Journal of Parasitology*, 88(6), pp. 1276–1278. doi:[10.1645/0022-3395\(2002\)088\[1276:COBSWT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2002)088[1276:COBSWT]2.0.CO;2).

Zhang, J. *et al.* (2017) 'Potential Antigens Involved in Delayed Xenograft Rejection in a Ggta1/Cmah Dko Pig-to-Monkey Model', *Scientific Reports*, 7(1), p. 10024. doi:[10.1038/s41598-017-10805-0](https://doi.org/10.1038/s41598-017-10805-0).

Zipfel, P.F. *et al.* (1999) 'The factor H protein family', *Immunopharmacology*, 42(1), pp. 53–60. doi:[10.1016/S0162-3109\(99\)00015-6](https://doi.org/10.1016/S0162-3109(99)00015-6).