

MELANİN VE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*'IN VİRÜLANSI ÜZERİNDEKİ ROLÜ

MELANIN AND ITS ROLE ON THE VIRULENCE OF *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*

Şehnaz ALP¹

¹ Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Enfeksiyon Hastalıkları Ünitesi, Ankara.
(sehnaz@hacettepe.edu.tr)

ÖZET

Bazı patojen bakterilerin, helmintler ve mantarlar tarafından sentezlenebilen melaninlerin konak savunma mekanizmalarına karşı koyabilme potansiyeli aracılığıyla mikrobiyal virülansa katkıda bulunduğu düşünülmektedir. *Cryptococcus neoformans*'ta melanin sentezinin, fagositoz ve fagositik öldürmeye karşı korunma sağlayabildiği ve etkenin bazı antifungal ilaçlara karşı direnç göstermesine neden olabildiği saptanmıştır. *C.neoformans*'ta bir virülans faktörü olarak tanımlanmış olan melaninin, mikrobiyal virülanstaki rolünün aydınlatılması, melanin polimerizasyonunu inhibe etmeyi hedefleyen tedavi ve/veya profilaksi yaklaşımlarının geliştirilmesine olanak tanıyabilecektir. Bu derleme yazıda, melaninin *C.neoformans*'ın virülansındaki rolleri tartışılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Cryptococcus neoformans*, melanin, virülans faktörü.

ABSTRACT

Melanins can be produced by some species of pathogenic bacteria, helminths and fungi. The production of melanin appears to contribute to microbial pathogenesis owing to its potential for protection against host defence systems. Melanin synthesis in *Cryptococcus neoformans* has been associated with virulence by the ability to protect against phagocytosis, oxidative injury and phagocytic killing. Moreover, it was shown that, melanization of *C.neoformans* has involved in protection against some antifungal compounds. The detection of the association between melanin and microbial virulence might provide new treatment and prevention strategies targeting the inhibition of melanin polymerization. In this review article, the impact of melanin on virulence of *C.neoformans* has been discussed.

Key words: *Cryptococcus neoformans*, melanin, virulence factor.

GİRİŞ

Melaninler, negatif yüklü, yüksek moleküler ağırlıklı, suda veya organik sıvılarda çözünmeyen, aside dirençli hidrofobik pigmentlerdir^{1,2}. Melaninlerin yapısına ilişkin kısıtlı

bilgi bulunmakla birlikte, polimerize fenolik ve/veya indolik bileşenlerden oluştuğu düşünülmektedir. Melaninlerin yapısının tanımlanmasındaki sorun, uygulanmakta olan biyokimyasal ve biyofiziksel yöntemlerin, bu kompleks polimerin kimyasal bileşimini ortaya koyamamasından kaynaklanmaktadır. Bunun nedeni, melaninin amorf, çözünemeyen ve eriyik hale getirilemeyen veya kristalografik çalışmalara uygun olmayan yapısıdır. Polimeri oluşturan monomerlerin tanımlanmasını sağlayan kabul edilebilir bir yöntem mevcut olmamasına rağmen, çeşitli analitik yöntemler melaninlerin özelliklerine ilişkin önemli bilgiler sağlayabilmektedir². Elektron paramagnetik rezonans (EPR) spektroskopisi özelliklerine göre melanin tanımlanabilmekte ve parsiyel kimyasal degradasyonunu takiben yüksek performanslı likid kromatografi (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) mikroanalizinin uygulanması ile melanin tipleri belirlenebilmektedir^{3,4}.

Memelilerde melanin sentezi, tirozinaz tarafından katalize edilmekte ve melanin sentez yolağında tirozin veya dihidroksifenilalanin kullanılmaktadır. Mikroorganizmalarda ise melanin, fenoloksidazlar (tirozinaz, lakkaz veya katekolaz) ve/veya poliketid sentaz yolağıyla sentezlenir. Tirozinazların aksine, lakkazlar tirozini 3,4-dihidroksifenilalanine (L-DOPA) dönüştüremez. Melaninler, genellikle siyah veya kahverengi pigmentler olarak bilinirse de diğer renkler de oluşabilir. L-DOPA'dan köken alan pigmentler siyah veya kahverengidir ve ömelaninler olarak tanımlanırlar. Sarı veya kırmızımsı melaninler, sistein ile L-DOPA içerirler ve feomelaninler olarak adlandırılırlar. Homoentisik asitten tirozinaz aracılığıyla sentezlenen kahverengimsi melaninler piyomelaninler olarak tanımlanırken, aseptattan poliketid sentaz yolağı aracılığıyla sentezlenen melaninler ise genellikle siyah veya kahverengidir ve dihidroksinaftalen (DHN) melaninler olarak bilinirler².

Mikroorganizmaların melanin üretebilme yeteneği patojenite ile ilişkilendirilmiştir. Bazı mantarlar, bazı bakteriler ve bazı helmintler melanin sentezleyebilmektedir. Melaninin virölanstaki rolü ile ilgili çalışmaların çoğunluğu mantarlar üzerinedir². Melanizasyon ve melanizasyonun virölansla ilişkisi en yaygın şekilde *Cryptococcus neoformans*'ta çalışılmıştır. *C.neoformans*'ın pigment oluşturabildiği ilk olarak Staib tarafından 1963 yılında gösterilmiştir⁵. *C.neoformans* tarafından üretilen pigmentin bir melanin olduğu 1995 yılında elektron spin rezonans (ESR) spektroskopisi kriterlerine göre⁶, 1998 yılında ise yıkım ürünlerinin kimyasal özelliklerine göre⁷ ortaya konulmuştur.

C.neoformans'ın melanin üretebilmesi için L-DOPA gibi fenolik substratlara gereksinim vardır⁸. *C.neoformans*'ın melanin sentezinde L-DOPA'yı kullanabiliyor olması bu mantarın nörotropizmini açıklayabilir. Dopamin, adrenalin ve noradrenalin, nörotransmitter olarak işlev görmek üzere santral sinir sisteminde bulunur ve bu moleküllerin yoğun olarak bulunduğu bölge olan bazal ganglionlar *C.neoformans* tarafından sıklıkla tutulurlar^{2,9}. *C.neoformans*'tan izole edilen melaninin C:N:O oranları L-DOPA'daki oranlara çok yakındır. Bu kimyasal benzerlik, *C.neoformans* melanininin L-DOPA türevlerinin polimerizasyonu sonucu oluştuğunu düşündürmektedir^{2,10}.

Melaninin Hücrelerdeki Yerleşimi

Mikrobiyal melanin hücre içinde veya hücre dışında bulunabilir. Transmisyon elektron mikroskopileri, melanize olmayan *C.neoformans* hücrelerinin hücre duvarına göre, mela-

nize *C.neoformans* hücrelerinin hücre duvarında elektrondan yoğun bir tabakanın varlığını ortaya koymuştur⁶. Ayrıca, melanin bağlayan antikorlar melanize *C.neoformans* hücrelerinin hücre duvarını işaretlemiştir¹¹. Melaninin hücre duvarında bulunmasına ilişkin elde edilen bu veriler, memelilerdeki yerleşimine göre önemli bir farklılık gösterdiğini ortaya koymaktadır. Memelilerde melanin, özel vakuoller olan melanozomlarda yer almaktadır².

Çevresel Koşullara Karşı Korunmada Melaninin Rolü

Serbest yaşayan organizmaların melanin üretme yeteneği, çevresel koşullarda yaşamlarını sürdürebilme avantajlarıyla ilişkilidir. Birçok mantar yapısal olarak melanin sentezler. *C.neoformans* gibi fakültatif melanotik mikroorganizmalar toprakta melanize olur. Melaninler, geniş bir elektromanyetik spektrumu absorbe edebildikleri için ultraviyole (UV) ışınlarına direnci sağlar ve ışık ile indüklenen hasarları önler². Melanize *C.neoformans* hücreleri melanize olmayanlara göre UV'ye daha az duyarlıdır¹². Melanin, *C.neoformans*'ı sıcaklık ve soğuğa karşı da korumaktadır. Sıcaklığa veya soğuğa maruz kaldığında melanize *C.neoformans*'ta hücre duvarı entegrasyonunun arttığı gösterilmiştir^{2,13}. Melaninler, çevrede bulunan, hücrelere potansiyel toksik ağır metalleri bağlayabilir. Karboksil, fenolik, hidroksil ve amin grupları potansiyel bağlanma bölgeleridir. Melanize *C.neoformans*, bakteriler ve mantarlara çok toksik olan gümüş nitrata karşı melanize olmayan suşlara göre daha dirençlidir¹⁴. Melanizasyonun ayrıca *C.neoformans*'ı, çevresel ortamda kriptokoklara saldırıp parçalama özelliği olan amiplerden koruduğu da ortaya konulmuştur¹⁵. Çevresel parçalayıcılar mikroorganizmaları parçalamak için hidrolitik enzimler kullanır. Melanize *C.neoformans* hücreleri, melanize olmayanlara göre hücre duvarını yıkan enzimlere daha az duyarlıdır¹⁶. Enzimatik hidrolize direnci sağlayan mekanizma tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır, ancak söz konusu direncin, enzimlerin melanin tarafından sekestrasyonu veya konfigürasyonlarının bozulması ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir^{1,2}.

C.NEOFORMANS'IN VIRÜLANSINDA MELANİNİN ROLÜ

Melanin sentezinin virülansla ilişkisi, sokak tipi suşlarla melanizasyonun olmadığı mutantların patojenitelerinin karşılaştırılmasıyla ortaya konulmuştur. *C.neoformans*'ın fenoloksidaz aktivitesinden sorumlu enzimi saflaştırılmış, tipik bir lakkaz olarak sınıflandırılmış ve klonlanmıştır. Lakkazı kodlayan genin (*CNLACT1*) virülansla önemli olduğu, sokak tipi suşta gen delesyonunun virülansı azalttığı ve melaninden yoksun suşun tümlenmesiyle virülansın arttığı gösterilmiştir^{2,17}. Aşırı pigmentli bir *C.neoformans* suşuyla enfeksiyonda immün cevabın afferent fazındaki inhibisyon, hafif melanize bir suştakine göre, azalmış TNF- α üretimi ve azalmış lenfoproliferasyonla gösterilmiştir¹⁸. Melanojenik olmayan *C.neoformans* suşuyla farede oluşturulan intraserebral enfeksiyon, minimal doku hasarı ve IL-12, IL-1 β ve TNF- α 'nın indüklenmesiyle sonuçlanırken, melanojenik suş yaygın hasar ve sitokin yanıtının inhibisyonuna neden olmuştur^{2,19}.

Sistemik bir herbisit olan glifozat ile melaninin inhibisyonu, deneysel kriptokokozda belirgin olarak sağkalım süresini uzatmıştır. Glifozata maruz kalmış enfekte hayvanlardan izole edilen kriptokokal hücrelerde melaninin bulunmadığı veya organizasyonunun bo-

zulduğu gösterilmiştir^{2,20}. Melanine karşı geliştirilen monoklonal antikorlarla tedavi, letal dozla enfekte farelerde sağkalımı belirgin olarak artırmıştır. Melanin bağlayan monoklonal antikor uygulanmış farelerde, melanin bağlayıcı özellik içermeyen monoklonal antikor uygulanan farelere göre, mantar yükü belirgin olarak daha azdır. İn vitro çalışmalarda, melanin bağlayan monoklonal antikorlar melanize hücrelerde hücre büyümesini durdururken, melanize olmayan hücrelerin replikasyonunda değişikliğe neden olmamıştır^{2,21}. Fungal melaninin immünolojik olduğunun gösterilmesinden¹¹ sonra melanine karşı monoklonal antikorlar oluşturulmuş ve enfekte dokulardaki *C.neoformans*'ın hücre duvarıyla reaksiyona girdiği gösterilmiştir²². Melanin bağlayan fajlar, dokulardaki kriptokokal hücre duvarını işaretlemiştir. Ayrıca, *C.neoformans* ile enfekte sıçanlarda melanine karşı antikor yanıtı stimüle olmuş ve bu durum in vivo pigment sentezi için immünolojik bir kanıt oluşturmuştur^{2,23}.

Bu kanıtlar, polimerize melaninin in vivo oluşturulduğunu tam olarak açıklayamamaktadır. Zira antikorun, immünolojik olan melanin öncüllerine bağlanması da olasıdır. Melaninin in vivo polimerizasyonunun direkt kanıtı, enzimler, denatürasyon ve sıcak asitle seri muamele sonucunda enfekte rodent dokularından izole edilen melanin partiküllerinin (ghost) izolasyonu ile gösterilmiştir. Elde edilen partiküller *C.neoformans* hücreleri ile benzer büyüklük ve şekildedir ve melanine özgül monoklonal antikorlarla işaretlenmiştir. Lakkaz negatif mutantlarla enfekte farelerde melanin partikül tanımlanmamıştır^{2,22}. Bu teknikler enfekte insan beyin dokusuna da uygulanmıştır. Melanin bağlayan monoklonal antikor ve fajlar, dokulardaki kriptokokal hücreleri işaretlemiş ve melanin bağlayan ajanlarla reaksiyona giren enzim, denatüran ve asit ile muamele edilen dokudan melanin partikülleri elde edilmiştir. Böylece enfeksiyon sırasında polimerize melaninin oluştuğu gösterilmiştir^{2,24}.

Oksidanlara Karşı Koruma

Metallere aşırı afinitesi olan melaninler, serbest radikallerin etkin temizleyicileridir ve elektron transfer edici özellikleri vardır. ESR spektroskopisi ile serbest radikallerden *C.neoformans* melaninine doğru elektron transferi gösterilmiştir⁶. Melanize kriptokokal hücreler, melanize olmayan hücrelere göre oksijen ve nitrojen radikallerine daha dirençlidir. Melanize *C.neoformans*'ın, hipoklorit ve permanganat ile öldürmeye daha az duyarlı olduğu gösterilmiştir. Albino mutantlar ise hiperoksijenasyona daha duyarlıdır^{2,6,25}.

Fagositoz ve Fagositik Öldürme Üzerine Etki

Melanize *C.neoformans* hücreleri melaninden yoksun hücrelere göre antikor aracılı fagositoza daha dirençlidir⁶. Fagositoz, *C.neoformans*'ın yüzey hidrofobisitesi ve hücre yüzeyinin elektrik yüküyle değiştirilebilir²⁶. Kapsüllü hücrelerde yüzey hidrofobisitesinde belirgin bir değişikliğe neden olamadığı için, melanizasyonun fagositozu önleme mekanizması bilinmemektedir. Bununla birlikte, melaninler yüklü polimerlerdir ve *C.neoformans*'ın hücresel elektrik yükü, özellikle polisakkarit kapsülü küçükse veya yoksa melanin varlığıyla belirgin derecede değişebilir²⁷. Melanizasyon, fagositozu azaltmanın yanı sıra *C.neoformans*'ın makrofajlarca öldürülmesini de önler⁶. Fagositik hücreler, reaktif oksijen türleri ile birlikte defensen ve farklı mikrobisidal peptidler üretebilirler. Melanize *C.neoformans*

mans hücrelerinin, melanize olmayan hücrelere göre bu bileşiklerin toksik etkilerine daha az duyarlı olduğu gösterilmiştir²⁸. Bu durumdan sorumlu mekanizma, mikrobisidal peptidin absorpsiyonu gibi gözükmemektedir. Böylece peptidin hedefine ulaşması önlenir. Pigmentli hücrelerde öldürmedeki azalma, melaninin oksidatif ve oksidatif olmayan hasara duyarlılığı azaltması nedeniyledir^{2,28}.

Antifungal İlaçlara Direnç

Melanin farklı bileşiklere bağlanabilmektedir. Amfoterisin B, geniş spektrumlu, potent bir antifungal ilaçtır. *C.neoformans*'ın L-DOPA varlığında üremesinin, amfoterisin B'ye karşı belirgin korunma sağladığı gösterilmiştir²⁹. İleri çalışmalar bu bulguyu desteklemiş ve melanizasyonun *C.neoformans*'ı kaspofungine karşı da koruduğunu, fakat flukonazol, itrakonazol ve flusitozine karşı koruyamadığını göstermiştir. Elementer analizler amfoterisin B veya kaspofungine maruz kalan melanin partiküllerinin C:N oranlarının değiştiğini ortaya koymuştur. Bu oran değişikliği, ilaçların melanin tarafından absorpsiyonuyla ilişkilidir. Diğer antifungal ajanlarla inkübasyon, elementer yapıda bir değişikliğe neden olmamıştır. Bu veriler ile, hücre duvarı kriptokokal melanininin amfoterisin B ve kaspofungine bağlandığı ve hedeflerine ulaşmalarını engellediği sonucuna ulaşılmıştır. İlginç olarak, melanize olan ve olmayan *C.neoformans* suşlarının makrodilüsyon yöntemiyle belirlenen MLK değerleri arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Bu durumun, antifungal duyarlılık testi için kullanılan besiyerinde melanin öncüllerinin bulunmaması veya bu yöntemin melaninin etkinliğini gösterebilecek duyarlılıkta olmaması nedeniyle ortaya çıktığı düşünülmüş; fenolik substratların antifungal duyarlılık testinde kullanılan besiyerlerine eklenmesi presipitasyon nedeniyle mümkün olamamıştır. Amfoterisin B ve kaspofunginin melanin ile inkübasyonu *C.neoformans*'a karşı antifungal aktivitelerini azaltmış; itrakonazol, flukonazol, flusitozin ile melaninin inkübasyonu ise antifungal duyarlılık sonucunda değişikliğe neden olmamıştır. Sentetik melanin ile inkübe edilmiş amfoterisin B ve sentetik melanin ile inkübe edilmiş kaspofungin ile yapılan zamana bağlı öldürme çalışmasında *C.neoformans* için belirlenen sağkalım oranları, melanin ile işlem görmemiş amfoterisin B ve kaspofungin uygulandığında belirlenen sağkalım oranlarına göre belirgin olarak daha yüksek bulunmuştur. Buna karşılık, azollerin ve flusitozinin melanin ile inkübasyonunun öldürme oranlarında anlamlı değişikliğe neden olmadığı belirlenmiştir^{1,30}.

Hücre duvarında melanin, aynı boyutta, çok sayıda farklı granüllerden oluşmaktadır. Granüler yapı çeşitli bileşiklere bağlanmaya olanak tanıyan yüzeyin geniş olmasını sağlar. Transmisyon elektron mikroskopi ile melanin partiküllerinin 40-100 nm boyutlarında, ortalama olarak 76 nm olduğu belirlenmiştir. Hücre duvar melanini 2-5 tabakadan oluşmaktadır. Tabakanın kalınlığı hücre yaşlanmasıyla birlikte artmaktadır. L-DOPA varlığında, *C.neoformans* hücrelerinin 10 gün süreyle enzim, denatüran, kloroform ve sıcak asitle muamele edilmesiyle izole edilen melanin partiküllerinin, nükleer manyetik rezonans kriyoporometri, az sayıda, yaklaşık 30 nm çapındaki porlara ek olarak, 1-4 nm çapında porların da bulunduğunu göstermiştir. Melanin bağlayan antikorlarla yapılan kriyoporometri çalışmaları, geniş porların daha içte yer aldığını ortaya koymuştur. Maya hücresinin yaşlanmasıyla porların çapı küçülmektedir. Melanin granülleri arasındaki dar açıklık amfoterisin B ve kaspofungin gibi büyük moleküllerin geçişini engelleyebilmekte

veya azaltabilmektedir. Azoller ve flusitozin daha küçük moleküller olduğu için, melanizasyonun hücre içine girişlerinde engel teşkil edemediği düşünülmektedir^{1,31}.

İmmünolojik Mekanizmalar

Melaninler immünolojik olarak aktif bileşiklerdir. Saflaştırılmış kriptokokal melaninin farelere enjeksiyonu sonucunda antikor yanıtı oluşur¹¹. Melaninin kullanıldığı katı faz ELISA yönteminin geliştirilmesiyle bu çalışmalar kolaylaştırılmıştır ve melanin bağlayan monoklonal antikorların tanımlanmasında kullanılmıştır^{22,32}. Deneyisel kriptokokozda melanine karşı antikorlar gelişmektedir²³. *C.neoformans* melanini, alternatif kompleman yolağını aktive etmektedir³³. *C.neoformans*'tan izole edilen melanin partiküllerinin fare peritonuna enjeksiyonu, karaciğer, dalak ve akciğerde granülom oluşumuyla sonuçlanmış; melanin partikülleri etrafında yabancı cisim reaksiyonuna benzer bir granümatöz inflamasyon oluşmuştur³³. Bu gözlemler, fungal melaninin sağlıklı bir faredede şiddetli inflamatuvar reaksiyon oluşturabileceğini göstermiştir. Melaninin konak enzimleri tarafından parçalanamayan bir yabancı cisim gibi davrandığı tahmin edilmektedir. *C.neoformans* ile enfeksiyon sırasında dokulara yayılan kapsüler polisakkaritin inhibitör etkisi nedeniyle inflamatuvar reaksiyon daha az şiddetlidir³⁴. Bununla birlikte, kronik ve latent enfeksiyonlardaki *C.neoformans* hücreleri, melanin partiküllerinde gözlendiği gibi, granülomlarla çevrelenmiştir³⁵. Dokulardaki maya hücrelerinin hücre duvarlarındaki parçalanamayan aşırı reaktif materyal, enfeksiyon sırasında potent bir immün modülatör olarak görev yapabilir. Aslında, latentlik ve granülom oluşumuyla ilişkili patojen mantarların çoğunluğu melanin oluşturur. Hücre duvarı ile ilişkili melaninin, dokuda parçalanamayan, sindirilemeyen bir yabancı cisim gibi davrandığı ve aynı zamanda da şiddetli inflamasyonu stimüle ettiği düşünülmektedir².

SONUÇ

Melaninden yoksun *C.neoformans* suşları hipovirulandır, fakat canlılığını sürdürebilmektedir. Yapılmış olan çalışmalar, melaninin *C.neoformans*'ta canlılığın sürdürülmesinde değil, konakta hasar oluşturulmasında gerekli bileşen olarak tanımlanan virülans faktörü tanımını karşılayabildiğini göstermektedir^{2,36}. *C.neoformans*, melanizasyonun mikrobiyal patogenezdaki öneminin anlaşılabilmesi için önemli bir örnek oluşturmaktadır. Melaninin mikrobiyal virülanstaki rolünün açıklığa kavuşturulması, melanin polimerizasyonunun inhibisyonunu hedefleyen tedavi ve/veya profilaksi yaklaşımlarının geliştirilmesine olanak tanıyabilmesi açısından önem taşımaktadır^{1,6}.

KAYNAKLAR

1. Nosanchuk JD, Casadevall A. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 3519-28.
2. Nosanchuk JD, Casadevall A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cell Microbiol* 2003; 5: 203-23.
3. Enochs WS, Nilges MJ, Swartz HM. A standardized test for the identification and characterization of melanins using electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. *Pigment Cell Res* 1993; 6:91-9.
4. Wakamatsu K, Ito S. Advanced chemical methods in melanin determination. *Pigment Cell Res* 2002; 15: 174-83.

5. Staib F. Membrane filtration and *Guizotia abyssinica* culture media for the demonstration of *Cryptococcus neoformans* (brown color effect). *Z Hyg Infektionskr* 1963; 149: 329-36.
6. Wang Y, Aisen P, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. *Infect Immun* 1995; 63: 3131-6.
7. Williamson PR, Wakamatsu K, Ito S. Melanin biosynthesis in *Cryptococcus neoformans*. *J Bacteriol* 1998; 180: 1570-2.
8. Kwon-Chung KJ, Tom WK, Costa JL. Utilization of indole compounds by *Cryptococcus neoformans* to produce a melanin-like pigment. *J Clin Microbiol* 1983; 18: 1419-21.
9. Lee SC, Dickson DW, Casadevall A. Pathology of cryptococcal meningoencephalitis: analysis of 27 patients with pathogenetic implications. *Hum Pathol* 1996; 27: 839-47.
10. Wang Y, Casadevall A. Melanin, melanin 'ghosts', and melanin composition in *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 1996; 64: 2420-4.
11. Nosanchuk JD, Rosas AL, Casadevall A. The antibody response to fungal melanin in mice. *J Immunol* 1998; 160: 6026-31.
12. Wang Y, Casadevall A. Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV light. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60: 3864-6.
13. Rosas AL, Casadevall A. Melanization affects susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to heat and cold. *FEMS Microbiol Lett* 1997; 153: 265-72.
14. Garcia-Rivera J, Casadevall A. Melanization of *Cryptococcus neoformans* reduces its susceptibility to the antimicrobial effects of silver nitrate. *Med Mycol* 2001; 39: 353-7.
15. Steenbergen JN, Shuman HA, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 15245-50.
16. Rosas AL, Casadevall A. Melanization decreases the susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to enzymatic degradation. *Mycopathologia* 2001; 151: 53-6.
17. Salas SD, Bennett JE, Kwon-Chung KJ, Perfect JR, Williamson PR. Effect of the laccase gene CNLAC1, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. *J Exp Med* 1996; 184: 377-86.
18. Huffnagle GB, Chen GH, Curtis JL, McDonald RA, Strieter RM, Toews GB. Down-regulation of the afferent phase of T cell-mediated pulmonary inflammation and immunity by a high melanin-producing strain of *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol* 1995; 155: 3507-16.
19. Barluzzi R, Brozzetti A, Mariucci G, et al. Establishment of protective immunity against cerebral cryptococcosis by means of an avirulent, non melanogenic *Cryptococcus neoformans* strain. *J Neuroimmunol* 2000; 109: 75-86.
20. Nosanchuk JD, Ovalle R, Casadevall A. Glyphosate inhibits melanization of *Cryptococcus neoformans* and prolongs survival of mice after systemic infection. *J Infect Dis* 2001; 183: 1093-9.
21. Rosas AL, Nosanchuk JD, Casadevall A. Passive immunization with melanin-binding monoclonal antibodies prolongs survival of mice with lethal *Cryptococcus neoformans* infection. *Infect Immun* 2001; 69: 3410-2.
22. Rosas AL, Nosanchuk JD, Feldmesser M, Cox GM, McDade HC, Casadevall A. Synthesis of polymerized melanin by *Cryptococcus neoformans* in infected rodents. *Infect Immun* 2000; 68: 2845-53.
23. Nosanchuk JD, Valadon P, Feldmesser M, Casadevall A. Melanization of *Cryptococcus neoformans* in murine infection. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 745-50.
24. Nosanchuk JD, Rosas AL, Lee SC, Casadevall A. Melanisation of *Cryptococcus neoformans* in human brain tissue. *Lancet* 2000; 355: 2049-50.
25. Wang Y, Casadevall A. Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to nitrogen- and oxygen-derived oxidants. *Infect Immun* 1994; 62: 3004-7.
26. Kozel TR. Dissociation of a hydrophobic surface from phagocytosis of encapsulated and non-encapsulated *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 1983; 39: 1214-9.
27. Nosanchuk JD, Casadevall A. Cellular charge of *Cryptococcus neoformans*: contributions from the capsular polysaccharide, melanin, and monoclonal antibody binding. *Infect Immun* 1997; 65: 1836-41.
28. Doering TL, Nosanchuk JD, Roberts WK, Casadevall A. Melanin as a potential cryptococcal defence against microbicidal proteins. *Med Mycol* 1999; 37: 175-81.

29. Wang Y, Casadevall A. Growth of *Cryptococcus neoformans* in presence of L-dopa decreases its susceptibility to amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 2648-50.
30. Van Duin D, Casadevall A, Nosanchuk JD. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 3394-400.
31. Jacobson ES, Ikeda R. Effect of melanization upon porosity of the cryptococcal cell wall. *Med Mycol* 2005; 43: 327-33.
32. Rosas AL, Nosanchuk JD, Gómez BL, Edens WA, Henson JM, Casadevall A. Isolation and serological analyses of fungal melanins. *J Immunol Methods* 2000; 244: 69-80.
33. Rosas AL, MacGill RS, Nosanchuk JD, Kozel TR, Casadevall A. Activation of the alternative complement pathway by fungal melanins. *Clin Diagn Laboratory Immunol* 2002; 9: 144-8.
34. Vecchiarelli A. Immunoregulation by capsular components of *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol* 2000; 38: 407-17.
35. Goldman DL, Lee SC, Mednick AJ, Montella L, Casadevall A. Persistent *Cryptococcus neoformans* pulmonary infection in the rat is associated with intracellular parasitism, decreased inducible nitric oxide synthase expression, and altered antibody responsiveness to cryptococcal polysaccharide. *Infect Immun* 2000; 68: 832-8.
36. Casadevall A, Pirofski LA. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect Immun* 1999; 67: 3703-13.