

**ÇEVRESEL ÖRNEKLERDE *CRYPTOCOCCUS* TÜRLERİNİN
ARAŞTIRILMASI VE EŞEY TİPİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DENİZ AKTAŞ

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**MERSİN
KASIM - 2019**

**ÇEVRESEL ÖRNEKLERDE *CRYPTOCOCCUS* TÜRLERİNİN
ARAŞTIRILMASI VE EŞEY TİPİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DENİZ AKTAŞ

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**Danışman
Prof. Dr. Aylin DÖĞEN**

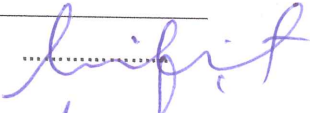


**İkinci Danışman
Dr. Öğ. Üyesi Engin KAPLAN**

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
2019-1-TP2-3466 nolu proje ile desteklenmiştir.


**MERSİN
KASIM - 2019**

ONAY

Deniz AKTAŞ tarafından Prof. Dr. Aylin DÖĞEN danışmanlığında ve Dr. Öğretim Üyesi Engin KAPLAN ikinci danışmanlığında hazırlanan “Çevresel Örneklerde *Cryptococcus* Türlerinin Araştırılması Ve Eşey Tipinin Belirlenmesi” başlıklı çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından ... Kasım 2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavı sonucunda oy birliği/çokluğu ile Yüksek Lisans Yeterlik tezi olarak kabul edilmiştir.

Görevi	Ünvanı, Adı ve Soyadı	İmza
Başkan	Prof. Dr. M. Macit İLKİT	
Üye	Prof. Dr. Mehmet Sami SERİN	
Üye	Prof. Dr. Aylin DÖĞEN	

Yukarıdaki Jüri kararı Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 28.11.2019... tarih ve 2019/547...sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Prof. Dr. Bahar TAŞDELEN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, tablo ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

ETİK BEYAN

Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinde belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlâk kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak kullandığımı,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Mersin Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,
- Tezin tüm telif haklarını Mersin Üniversitesi'ne devrettiğimi

beyan ederim.

ETHICAL DECLARATION

This thesis is prepared in accordance with the rules specified in Mersin University Graduate Education Regulation and I declare to comply with the following conditions:

- I have obtained all the information and the documents of the thesis in accordance with the academic rules.
- I presented all the visual, auditory and written informations and results in accordance with scientific ethics.
- I refer in accordance with the norms of scientific works about the case of exploitation of others' works.
- I used all of the referred works as the references.
- I did not do any tampering in the used data.
- I did not present any part of this thesis as an another thesis at Mersin University or another university.
- I transfer all copyrights of this thesis to the Mersin University.
-

15 KASIM 2019

imza

Deniz AKTAŞ

ÖZET

Çevresel Örneklerde *Cryptococcus* Türlerinin Araştırılması ve Eşey Tipinin Belirlenmesi

Cryptococcus Türleri bitkilerde ve hayvanlarda yaşayabilen kapsüllü bir maya mantarıdır. Özellikle immün sistemi düşük kişilerde kriptokokoz'a sebep olmakla birlikte her yıl yaklaşık 625 bin kişinin bu mantar türünden hayatını kaybettiği bilinmektedir. Bazidiomiçet funguslarında çiftleşme MAT lokusu olarak adlandırılan bir eşey gen bölgesi tarafından yönetilmektedir. Her bir fungusun MAT lokus uzunluğu ve gen içeriği birbirinden farklıdır. Ayrıca *Cryptococcus* türlerinin eşeyli üremesi Dünya üzerinde bu maya mantarının çok fazla yayılmasına da sebep olmaktadır. MAT lokusu ayrıca virülans faktörlerinde de büyük bir role sahiptir.

Bu çalışmada Gülnar'dan Hatay iline kadar olan bölgeden topladığımız toplam 750 örnekte *Cryptococcus* 'un eşey tipi gen bölgesinin (MAT lokus) karakterizasyonu belirlenmesi amaçlanmıştır. Toplanan 750 örnekte; 236 adet ökaliptus, 303 adet zeytin ve 211 adet keçiboynuzu izolatu elde edilmiştir ve 97 (%12,9) tanesinde üreme görülmüştür. *Cryptococcus* türlerinin genomunda yer almakta olan MAT Aa, MAT A α , MAT Da, Mat D α ve SXI 2a 1 α primerlerinin sırasıyla 457bp, 330bp, 728bp, 592bp ve 2529bp, 1354bp'lik DNA bölgesi PCR yöntemi ile çoğaltıldı. Üreme görülen 97 *Cryptococcus* türünün %100'ü MAT A α serotipinde olup *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* olduğu bulundu.

Çevresel örneklerden izole edilen *Cryptococcus* türlerinde eşeyli çoğalmada rol oynayan genlerin (MAT), virülans ve patogenezdaki rolleri anlaşıldıkça, mikozların tanısında ve farklı hedeflere yönelik yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi ve/veya mevcut tedavi yöntemlerinin yönlendirilmesine yol gösterici olacaktır.

Anahtar Kelimeler: *Cryptococcus*, eşey gen bölgesi, MAT locus, eşeyli üreme, virülans, çevresel örnek.
Danışman: Prof. Dr. Aylin DÖĞEN, Mersin Üniversitesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin.
İkinci Danışman: Dr. Öğretim Üyesi Engin KAPLAN Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Zonguldak.

ABSTRACT

Investigation of *Cryptococcus* Species in Environmental Specimens and Determination of Sex Type

Cryptococcus Species is an encapsulated yeast that can live in plants and animals. Although it causes cryptococcosis especially in people with low immune system, it is known that approximately 625 thousand people die from this fungus every year. In basidiomycet fungi, mating is directed by a genome region called the MAT locus. The MAT locus length and gene content of each fungi are different from each other. In addition, sexual reproduction of *Crptococcus* species causes the spread of this yeast in the world. The MAT locus also plays a major role in virulence factors.

In this study, it was aimed to determine the characterization of the genotype (MAT locus) of *Cryptococcus* in 750 samples collected from Gülnar to Hatay. 750 samples collected; 236 eucalyptus, 303 olive and 211 carob isolates were obtained and 97 (12.9%) of them were isolated. 457bp, 330bp, 728bp, 592bp and 2529bp, 1354bp DNA region of the primers of MAT Aa, MAT A α , MAT Da, Mat D α and SXI 2a 1 α which are in the genome of *Cryptococcus* species were amplified by PCR method. Of the 97 *Cryptococcus* spp., 100% were mat A α serotypes with *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*.

As the roles of genes (MAT) involved in sexual proliferation (virulence and pathogenesis) in *Cryptococcus* species isolated from environmental samples are understood, it will guide the development of new therapeutic approaches to the diagnosis and mycosis of different mycoses and / or guidance of existing treatment methods.

Keywords: *Cryptococcus*, sexual gene region, MAT locus, sexual reproduction, virulence, environmental sample.

Advisor: Assoc. Prof. Aylin DÖĞEN, Department of Pharmaceutical Microbiology, University of Mersin, Mersin.

Second Advisor: Asist. Prof. Engin KAPLAN Basic Pharmaceutical Sciences Department of Pharmaceutical Microbiology, Zonguldak Bülent Ecevit University, Zonguldak

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, değerli bilgilerini benimle paylaşan, kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle bana faydalı olabilmek için elinden gelenden fazlasını sunan her sorun yaşadığımda yanına çekinmeden gidebildiğim, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen ve gelecekteki mesleki hayatımda da bana verdiği değerli bilgilerden faydalanacağımı düşündüğüm kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Aylin DÖĞEN'e teşekkürü borç biliyor ve şükranlarımı sunuyorum. Laboratuvar çalışmalarına bilgi ve deneyimi ile katkıda bulunan Prof. Dr. Çağrı ERGİN'e teşekkür ederim. Bu süreçte bilgi ve yardımlarını esirgemeyen ikinci danışmanım Dr. Öğretim Üyesi Engin KAPLAN'a, Dr. Öğretim Üyesi Serpil GONCA'ya, Dr. Arş. Gör. Zehra ÖKSÜZ'e, teşekkür ederim. Hayatım boyunca beni destekleyen sevgi ve ilgileriyle her daim yanımda olan başta annem Ayten AKTAŞ'a, babam Ali AKTAŞ'a, ablam Değer AKTAŞ'a, anneannem Naime ÖZGÖZ'e ve beni hiçbir şekilde yalnız bırakmayan yol arkadaşım Ahmet ALKAYA'ya sevgi dolu teşekkürler.



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	i
ONAY	ii
ETİK BEYAN	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLOLAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR ve SİMGELER	x
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	2
2.1. Tarihçe	2
2.2 Taksonomik Özellikler	3
2.3. Antijen ve Polisakkarit Kapsül	4
2.4. Melanin Yapı	9
2.5 Hücre Duvarı	14
2.5.1 α -1,3-glukan	15
2.5.2 β -1,3-glukan	15
2.5.3 Kitin / Kitosan	15
2.5.4 Fosfolipaz B1	17
2.5.5 Lakkaz	17
2.6. MAT Lokusu	17
2.8. Ekolojik Yapı	26
2.9. Çevre Ve Konak; Genomik Yaklaşım	27
2.10. Çevresel Niş	29
2.10.1 <i>C. neoformans</i>	31
2.10.1.2. <i>C. neoformans</i> 'ın Çevresel Kaynakları	31
2.10.1.3. Ağaçlar	31
2.10.2. <i>C. gattii</i>	32
2.10.2.1. <i>C. gattii</i> 'nin Çevresel Kaynakları	32
2.11. Kriptokokal Hastalıkta Halk Sağlığının Önemi: Epidemiyoloji, Yük ve Kontrol	32
2.12. Klinik Yaklaşım	34
3. MATERYAL ve YÖNTEM	36
3.1. Moleküler Yöntemler	38
3.1.1. Örneklerden DNA Ekstraksiyonu	38
3.1.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	39
3.1.3. Eşey Gen Bölgesi için PCR	39
4. BULGULAR	42
5. TARTIŞMA	44
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	46
KAYNAKLAR	47
ÖZGEÇMİŞ	64

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 1. Çalışma Süresince Elde Edilen İzolat Bilgileri	36
Tablo 2. ITS 1-4 PCR Koşulları	39
Tablo 3. Çalışmada Kullanılan <i>Cryptococcus neoformans</i> Primerleri	40
Tablo 4. Her Eşey Gen Bölgesine Ait PCR Reaksiyon Karışımları	40
Tablo 5. MAT Da PCR Koşulları	40
Tablo 5.1 MAT Aa, MAT Aα, MAT Dα PCR Koşulları	41
Tablo 6. Üreme Görülen İzolatlar ve Yer Bilgileri	42
Tablo 7. <i>Cryptococcus</i> Olduğu Belirlenen Örneklerde MAT Aa, MAT Aα, MAT Da, MAT Dα ve SXI 2a, SXI 1α oranları	43

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1. Çini Mürekkebi ile Boyanmış Kapsül Fotoğrafi	4
Şekil 2. <i>C. neoformans</i> 'ın Staib Besiyerinde Melanin Pigmenti Oluşturması	10
Şekil 3. <i>Crptococcus</i> Üreme Yapısı (MAT)	21
Şekil 4. <i>Cryptococcus</i> Yönünden Taranmış Olan Bölgeler	35
Şekil 5. Zeytin ağacı üzerindeki kovuklar(Orijinal)	37
Şekil 6. Ağaç Kovuklarından Örnek Alımı (Orijinal)	37
Şekil 7. Eşey Gen Bölgesine Ait PCR Jel Görüntüsü (Orijinal)	43



KISALTMALAR ve SİMGELER

Kısaltma/Simge	Tanım
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
GXM	Glukuronosilomannan
GalXM	Galaktoksilomannan
MAb	Monoklonal Antikor
Csr2p	Biyosentetik Regülatör
LAC	Lakkaz enzimi
CC2	Cryptocyanin
ATX	Copper Transport Protein
TEM	Transmisyon Elektron Mikroskopu
GlcNAC	N-asetilglukosamin
CDA	Kitin Deasetilaz
HEX	N-asetilheksosaminidaz
Plb1	Fosfolipaz B1
PIR	Protein Information Resource
MAT	Çiftleşme Tipi Lokusu
Asg	A Spesifik Gen
HMG	High Mobility Group
SLAD	Süper Düşük Amonyum Amonyum Dekstroz
IAA	İndoleasetik Asit
MS	Murashige ve Skoog Besiyeri
WC	Beyaz Yakalı Protein
BWC	Korunan Beyaz Yakalı Protein
MAPK	Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz
CAMP	Halkasal Adenozin Monofosfat
YPD	Maya Özü Pepton Dekstroz
STE3a (CPRa)	Feromon Reseptör Genleri
STE3α (CPRα)	Feromon Reseptör Genleri
Gpa	G proteini a Alt Birimi
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HAART	Yüksek Derecede Aktif Antiretroviral
MFa1	Mating Hormone A Factor
STE20a/α	Serine/Threonine- Protein Kinase
STE11a/α	Serine/Threonine- Protein Kinase
STE12a/α	Serine/Threonine- Protein Kinase

Kısaltma/Simge	Tanım
SPO14	Regulator of Phospholipase
RUM1	Regulator Ustilago Maydis 1 Protein
BSP1	Binding of Synaptojanin Polyphosphoinositide Phosphatase Domain Protein 1
CID1	Terminal Uridylytransferase 1
ARV	Antiretroviral
CrAg	Kriptokokal Antijen
DNA	Deoksiribonükleik asit
TEN	Tris-Edta-NaCl
SDS	Sodyumdodesilsülfat
PCR	Polimeraz Chain Reaction
CGB	Kanavanin Glisin Bromtimol



1. GİRİŞ

Cryptococcus türleri bazidiomycet sınıfından kapsüllü bir maya mantarı olup kriptokokkoz etkenidir. Enfeksiyöz mantar yapılarının kolonize olduğu çevresel ortamdan, insana solunum yolu ile bulaşması sonucunda hastalık oluşur. *Cryptococcus neoformans* enfeksiyon etkeni olmadan üst solunum yolunda kolonize halde de bulunabilir. Çoğunlukla immün sistemi baskılanmış konakta (AIDS, kanser kemoterapisi, yaygınlaşan organ transplantasyonu vb.) etkenidir. Öncelikle santral sinir sistemi enfeksiyonu yapmakla birlikte deri, göz, miyokard, kemik, eklem, akciğer, prostat ve üriner sistemde de enfeksiyona neden olur [1,2].

Cryptococcus neoformans var. *grubii*, serotip A, tüm dünyada yaygın olup daha çok kanatlı dışkısı ile bulaşlı toprakta bulunur [3]. Bu varyeteye *Eucalyptus* spp. dışında *Syzygium cumini*, *Ficus religiosa* ve başka ağaç türlerinde rastlandığı bildirilmiştir. Buna karşılık, *C. neoformans* var. *neoformans*, serotip D, daha çok Avrupa'da görülür ve insan enfeksiyonlarından sorumludur [4,5]

Ayrıca, bu serotipe, Brezilya'da *E. camaldulensis* ve *E. tereticornis*'de, ABD'nde *Quercus alba*'da, ülkemizde ise güvercin dışkısında rastlanmıştır. Aynı zamanda *C. neoformans*'ın bu ortamda eşeyli çoğalabilmesi Dünya üzerinde mayanın yayılabilmesine olanak sağlamakta, immünsüprese hastalar için risk ortamı oluşturmaktadır [1,5].

Ülkemizde yapılan çeşitli araştırmalarda ökaliptus ağaçlarında *Cryptococcus* spp. varlığı araştırılmış ve bu çevresel odakta bu maya mantarının varlığına rastlanmıştır [6]. Ergin ve ark.'ları tarafından Türkiye'nin ilk defa belirli bölgelere ait *C. neoformans* kolonizasyon risk haritası çıkarılmıştır (sözel bildirim). Daha fazla bölgesel veri elde etmek, benzer risk bölgelerinin tanımlanmasını kolaylaştıracaktır. Bu yaklaşım, çevresel odak bulunan yerlerde daha sık görülebilecek kriptokokkoz olgularının klinik ön tanısı için yararlı olacaktır. Bu nedenle bölgemizde bulunan ökaliptus, zeytin, kestane ve keçiboynuzu ağaçlarında *Cryptococcus* türlerinin varlığının araştırılması ve bu kökenlerde eşey üreme tipinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Tarihçe

Freeman'a göre ilk olarak kriptokokoz 1861'de Zenker tarafından tarif edilmiştir [7]. Ancak bu görüş mikrobiyal kültür kanıtı olmadığı için sorgulanmıştır. 1894 de Alman patolog Otto Busse bir kadına ait tibia sarkomu benzeri lezyonda büyük hücrelerin içinde ve dışında yuvarlak oval bir "korpüsküler" gözlemlemiştir [8]. Busse mikroorganizmayı izole edip hastaya tekrar verdiğinde patojenitesini doğrulamış ve hastanın enfeksiyondan öldüğünü görmüştür. Hastayla ilgilenen fizikçi Buschke aynı patojenin hastadaki cilt dökülmelerini gözlemleyerek bunun koksidiyum olduğunu düşünmüştür. Bu nedenle, kriptokokların tanımı Busse ve Buschke'ye dayanmaktadır [9].

Busse ile aynı yılda Francesco Sanfelice şeftali suyundan kapsüllü bir mayayı izole ederek buna *Saccharomyces neoformans* adını vermiştir. Bu isimlendirmeye birlikte Neoformans türünün taksonomik yeri belirlenirken bu sırada Busse'de mantarı *Saccharomyces* olarak adlandırmıştır. 1895'de Sanfelice, *S. neoformans* ve Busse'nin mantarı arasındaki benzerliği fark etti ve aynı zamanda *S. neoformans*'a benzer bir mayayı bir öküzün lenf düğümünden izole ederek patojenitesini doğrulamıştır [10].

1901'de Vuillemin karbonu fermente edemeyen ve *Saccharomyces* cinsini andıran, askospor eksikliğine bağlı olarak, Busse ve Sanfelice mantarlarını *Cryptococcus* cinsine *C. hominis* ve *C. neoformans* olarak aktarmıştır [11].

1902'de Frothingham, bir atta Busse ve Buschke tarafından izole edilmiş mantarlara benzer bir patojenik mayayı akciğer lezyonundan izole etmiştir. Bu bulgu Sanfelice'nin mayayı öküzden izole etmesiyle hem insanlarda hem de hayvanlarda enfeksiyona neden olabileceğini ortaya koymuştur [12].

Kriptokokal menenjit tanısı ilk olarak bir kadında 1914 yılında Verse tarafından tanımlanmıştır [13]. İki yıl sonra Stoddard ve Cutler iki yeni menenjit vakası kaydedip *Torula histolyca* adını vermiş, fakat bu adlandırma 1950'lere kadar devam etmiştir [14].

1935' yılında Benham insanlardan izole edilen 22 patojenik ve patojenik olmayan kriptokok suşu içeren birçok maya ile çalışma yürütmüş ve bu 22 suş Busse ve Curtis tarafından izole edilen *Cryptococcus*, *Saccharomyces* ve *Torula* adı altında olan cinsleri de içermiştir [15].

1949'da Evans kriptokokoz hastalarından izole edilen suşlar arasında serolojik farklılıklar keşfetti ve A, B ve C olmak üzere üç serotip tanımladı [16]. Dördüncü serotip D 20 yıl sonra bir izolatta Vogel tarafından tanımlanıp Wilson ve arkadaşları tarafından doğrulanmıştır [17].

1950' de Benham toruloz ve torula menenjit adının yerine kriptokokozis konmasını ve mikroorganizma adının *Cryptococcus neoformans* haline gelmesini önermiştir.

Cryptococcus cinsi ilk kez 1833 yılında Kützing tarafından kirli bir pencereden izole edilmiştir [18]. 1901'de Vuillemin, 1894 'de Busse ve Sanfelice tarafından izole edilen mikroorganizmalardan biri Almanya'daki bir hastanın nekrotik lezyonundan diğeri ise şeftali suyundan izole edilen *Saccharomyces* cinsiydi. Her iki mikroorganizma incelenerek *Cryptococcus* cinsinin tanımı değişerek *C. neoformans* ve diğeri türlere ayrılmıştır [11].

1935 yılında Benham *Cryptococcus* cinsinin tanımını hem patojenik hem de patojenik olmayan ve hem fermente hem de fermente olmayan mayaları içerecek şekilde genişletmiştir [17].

1952'de Lodder ve Kreger-Van Rij, Vuillemin tarafından değiştirilen genel tanımı kabul etmiştir, ancak fermentasyon yapmayan kapsüllenmiş nişasta üreten mayaları içerecek şekilde genişletmiştir [19]. Lodder ve Kreger-Van Rij *C. neoformans*'ı cinsin cinsi olarak tanımlamış olup Phaff ve Spencer nişasta oluşumunu tanısal bir kriter olarak kullanmadı ve cinsi myoinositol kullanabilen ve psödohif veya gerçek hifa üreten ya da hiç hifa üretmeyen mayalarla sınırlandırdı [20].

Rodrigues de Miranda ve iş arkadaşı, Kützing'in materyalini elektron ve ışık mikroskobu ile inceleyerek bazidiyomiyoz maya hücrelerini tespit etmişlerdir [21].

Şu anda cins hem patojenik hem de patojenik olmayan 70 tür içermektedir. Bu türlerin bazıları, *Basidiomycota Tremellomycetes*'inde *Filobasidium*, *Filobasidiella*, *Cystofilobasidium* ve *Kwoniella* gibi cinislere ait teleomorfik bir durumdadır [22].

2.2 Taksonomik Özellikler

Cryptococcus cinsi Eumycota aleminin, Basidiomycota bölümüne, Basidiomycetes sınıfında, Filobasidiales takımında, Filobasidiaceae ailesinde yer almaktadır.

Cryptococcus cinsi yalnızca anamorf durumlarında bilinen 70 tür içermektedir. Türler *Tremellomycetes* (alt sınıf Agaricomycotina, Basidiomycota), *Tremellales*, *Filobasidiales*,

Trichosporonales, *Cystofilobasidiales* gibi belli başlı soylara aittir. *C. neoformans* ve *C. gattii* teleomorfu olan türlerdir [23].

2.3. Antijen ve Polisakkarit Kapsül

Cryptococcus neoformans ve *Cryptococcus gattii*'nin boya ile muamelesi sonucunda belirgin morfolojik özellik olarak hücre etrafında bir polisakkarit kapsül görülmektedir. Bu kapsül yapısı virülans bakımından çok önemli olup yıllardır birçok çalışmanın da ana konusu olmuştur. Virülans mekanizması konağın immün tepkisine karşı olan müdahaleyi ve hücrenin konağın immün sisteminden korunmasını sağlamaktadır. İmmün sistemin bu etkileri arasında apoptoz baskılanması, fagositozla giriş, indirgenmiş antijen sunumu ve in-vitro invaziv büyüme yer almaktadır [24, 25]. Ayrıca, kapsülün sitotoksik serbest radikalleri, konağın mikrobisidal mekanizmalarına karşı koruma sağlamaktadır [26]. Bu etkileşim için kapsül yapısının önemi büyüktür (Şekil1).



Şekil 1. Çini Mürekkebi ile boyanmış Kapsül Fotoğrafı (Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikoloji arşivinden)

Kapsül yapı olarak polisakkaritten oluşmuştur. Yapılan çalışmalar sonucunda iki farklı polisakkarit türü olduğu bulunmuş olup bunlar; glukuronoksilomannan (GXM) ve galaktoksilomannandır (GalXM) [27].

GXM, glukuronik asit ve ksiloz bulunan zincir şeklinde mannoz içermektedir. Mannosil beta-1-4 bağlantılarında ksilosil birimleri ile ilişkilendirilmektedir. Kapsülde en çok bulunan yapıdır (%90-95). Bu nedenle kapsül çalışmalarında en fazla bu kısma yoğunlaşmıştır. Ayrıca, GXM kapsül boyunca eşit bir şekilde yerleşmiştir [28].

Ksiloz ve mannoz ile galaktoz atıkları tarafından oluşan GalXM yapısı ise galaktan olarak adlandırılmaktadır. Bu yapının hücre membranındaki yeri tam olarak bilinmemektedir. Yapılan çalışmalar GalXM'nin kapsül içinde mevcut ve zorunlu olarak kapsüller bir yapısal bileşen olmadığını göstermektedir [29]. GalXM, GXM'e göre daha güçlü olabilecek immünomodülatör özelliklere sahiptir. Polisakkaritler ile birlikte sıklıkla mannon proteinler içermekte fakat bunların işlevi henüz bilinmemektedir [30].

Mannoz atıklarının asetilasyonu kapsüle antijenik özellik kazandırmaktadır. Kapsül, polisakkaritten oluşmasına rağmen, polisakkaritler yoğun hidrofilik yapısından dolayı yüksek oranda hidratlanarak kapsülün hacim ve ağırlığının %99'unu oluşturmaktadır [31]. Kapsülü oluşturan polisakkaritler sadece kapsülü oluşturan hücreye bağlanmış olarak bulunmaz, aynı zamanda süpernatantta çözünebilmekte ve ekzopolisakkaritler olarak da bilinmektedir [32].

Kapsül bileşimi suşlar arasında büyük ölçüde değişmekte olup bu değişim 106 kökenin GXM yapısını analiz eden çalışmalarda bildirilmiştir. GXM'deki ksiloz, mannoz ve glukuronik asit kalıntılarının molar oranları serotipe bağlı olarak farklılaşmaktadır [31].

İlk çalışmalar, ana serotipler arasındaki asetilasyon ve ksilosil süstitüsyonlarında farklılıklar olduğunu göstermiştir [31]. Bazı *C. neoformans* suşlarında GXM, tekrarlayan bir tek birimden oluşurken, diğer suşlarda polisakkarit, çoklu birimler içerir. Ayrıca, aynı tekrarlayan birimler kümesini kullanan suşlar, genellikle GXM molekülü içindeki birimlerin oranı birbirinden farklıdır. Bu yapısal değişiklikler, hafif yapısal antijenik farklılıklara neden olur [28]. GalXM ile ilgili olarak, galaktoz, ksiloz ve mannozun molar oranları, farklı serotiplerde (GXM'de olduğu gibi) değişmekte; bu GalXM'nin aslında yakından ilişkili olduğu karmaşık bir polisakkarit grubudur. [32].

C. neoformans kapsülünü spesifik olarak tanıyan birçok farklı MAb elde edilmiştir [33, 34]. Kapsülün ana bileşenine (GXM) karşı MAb'lerin geliştirilmesi, kapsülün kimyasal ve antijenik bileşimindeki inter-interserotip ve aynı zamanda intratren seviyesinde dahil olmak üzere birden fazla düzeyde varyasyonun araştırılması için güçlü kanıtlar sağlamıştır. Aynı GXM molekülleri için etkinlikleri ve spesifikliği bakımından farklılık gösteren bir MAb grubu, GXM yapısının moleküler seviyede oldukça heterojen olduğu ve bu yapısal heterojenliğin çoklu epitopların ifadesine çevrildiği ile tutarlılık sağlamıştır [33, 34]. MAb'lerin kapsüle bağlanması değişkendir, halka ve nokta şeklinde iki bağlanma modeli tanımlanmış olup bu durum, kapsüldeki MAb'ların immünglobulin M ile bağlanması olarak tarif edilmiştir [35].

Flüoresans bağlanma modeli ile MAb'lerin koruyucu etkinliği arasında sırasıyla koruyucu ve koruyucu olmayan etkilerle korele olan halka şeklindeki ponksiyonlu paternler arasında bir ilişki vardır [35]. Bu veriler, koruyucu olmayan bir etkiye sahip enfeksiyon sırasında üretilen antikörlerin bağlanmasının, noktalayıcı bir bağlanma düzeni vermesi ile desteklenmiştir [36]. Bununla birlikte, bazı durumlarda, MAb'nin bağlanma düzeni, serotip A suşlarında halka şeklinde olan ve sivri uçlu noktalarda bulunan serotipine bağlıdır. Serotip D, kapsül yapısının serotipe bağlı olarak oldukça heterojen olduğu fikrini desteklemektedir.

Kapsül yapısındaki heterojenlik, konakçı ile etkileşim sırasında önemli sonuçları olabilecek bir özellik olan antijenik ve biyolojik varyasyona çevrilme potansiyeline sahiptir. Kapsül yapısındaki değişikliklerin konakçı ile etkileşimin sonucunu etkilemesi, farklı serotip A suşlarından kapsüller olmayan mutantlardan izole edilmiş saflaştırılmış kapsüller polisakarit eklenmesinin fagositoz üzerinde farklı etkileri olduğu gözlemini desteklemektedir [37].

Sonuç olarak, kapsül yapısındaki değişiklikler, *C. neoformans*'ın fagositik hücreler tarafından tanınması ve buna bağlı olarak, immün tepkiden kaçışına katkıda bulunabilecek farklı immün yanıtların gelişmesi üzerinde derin bir etkiye sahip olabilmektedir. Konakçı ile etkileşim sırasında kapsülde yapısal ve antijenik değişiklikler tarif edilmiştir. Deneysel enfeksiyon sırasında, *C. neoformans* kapsülü, bazı MAb epitoplarının birikmesi ile gösterildiği gibi önemli yapısal değişikliklere uğramaktadır [37]. Aynı çalışmada, kapsül antijenik yapısının enfekte olmuş organa bağlı olarak farklı olduğu bulunmuş olup mantar hücre popülasyonu akciğerlerde ve dalakta beyinden daha homojen şekilde görülmüştür. Bu bulgular, kapsülün yapısal ve antijenik heterojenitesinde çevrenin önemini vurgulamaktadır. Kapsüller değişiklikler, fungal hücrelerin kan-beyin bariyeri boyunca geçişi ile ilişkilendirilmiştir [37]. Ayrıca, bu çalışma *C. neoformans* hücrelerinin, in vitro olarak ifade edilmeyen bir MAb için epitopları eksprese ettiğini ve dokudaki yeni polisakaritlerin ekspresyonunu belirttiğini göstermiştir.

C. neoformans kapsülünün çarpıcı bir karakteristik özelliği, zorlanma ve çevresel koşullara bağlı olarak boyut değişebilmesidir [38]. Kapsülün genişlemesi ilk enfeksiyon saatlerinde gerçekleştiği için bu morfolojik değişim enfeksiyon sırasında önemli bir rol oynamaktadır. Mantar hücreleri, kapsül büyümesini indükleyen çeşitli ortamlara yerleştirilerek in vitro olarak çoğaltılabilir. İn vitro kapsül büyütme olgusu, 1950'lerde Littman tarafından rapor edilmiş olup kapsül büyümesinin indüklendiği birkaç minimal ortamı tarif etmiştir. Daha sonra, demir sınırlaması, yüksek bir CO₂ konsantrasyonu ve memeli serumu dahil olmak üzere başka koşullar tarif edilmiştir. Daha yakın zamanlarda, düşük miktarda besin maddesi ve hafif bazik pH içeren ortamların da kapsül büyümesini indükleyebildiği görülmüştür. Kapsül genişlemesini engelleyen faktörler, ozmotik basınç ve şeker konsantrasyonunda bir artış içermektedir [39, 40].

Bu koşulların kapsül büyümesindeki değişikliklere dönüşme mekanizmaları bilinmemektedir. İlginç bir şekilde, kapsül büyümesini indükleyen faktörler, memeli enfeksiyonu sırasında bulunan fizyolojik koşullara benzemektedir. Kapsül büyütme, önceden var olan polisakarit tamponlarının genişletilmesi ve/veya yeni polisakarit moleküllerinin eklenmesi ile düşünülebilmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, kapsül genişlemesinin, kapsülün yeni bir polisakarit ilavesiyle meydana geldiğini göstermiştir; bu, kapsülün yoğunluğunda, özellikle hücre duvarına yakın bölgelerde önemli bir artışa neden olmaktadır. Polisakarit moleküllerinin önceden var olanlara bağlanması, kendiliğinden birleşmeyle ortaya çıkmaktadır. İlginç bir şekilde, kapsül genişlediğinde, eklenen yeni polisakarit, farklı kimyasal ve fiziksel özellik gösterdiği gibi önceden var olan eski yapılardan farklı görünmektedir [41]. Yoneda ve Do-ering, kapsül büyümesi sırasında polisakarit moleküllerinin boyut dağılımının, yeni molekül tipleri oluştuğu kütle ve/veya yük değişiklikleri öneren bir gözlem olan jel elektroforez göçüne göre farklı olduğunu bulmuştur [42]. Kapsül büyümesinden önce ve sonra kapsüller polisakaritin ölçülmesi, kapsüller büyütme sırasında polisakarit moleküllerinin çapının arttığını göstermiştir [43]. Diğer araştırmacılar, antijenik kompozisyonu ve kapsülün boyutunun indüklenmesinden sonra fiziksel özelliklerini incelemiştir. Kapsül yoğunluğundaki değişikliklere ek olarak, kapsül genişlemesi, epitoplara heterojen bir dağılımına ve kapsülün farklı bölgeleri arasında zeta potansiyelindeki farklılıklara neden olmaktadır. Bu bulgular, kapsül genişlemesinin, önceden var olan moleküllerden farklı fiziksel ve antijenik özelliklere sahip yeni polisakarit moleküllerinin birikmesiyle sağlandığı fikrini desteklemektedir. Kapsülün termal bölgesine göre yapıdaki farklılıklar, etkileşim sırasında da önemli sonuçlar doğurabilir, çünkü bunlar fagositik hücreler tarafından tanınmaya ek olarak antikorların ve tamamlayıcı proteinlerin lokalizasyonunu da etkileyebilmektedirler [37].

Bazı araştırmacılar kapsül genişlemesinin gerçekleştirildiği mekanizmaları incelemiş ve bu çalışmaların genel yaklaşımı kapsülü genişlemeden önce etiketlemeyi içermekte olduğunu bildirmişlerdir. Böylece indüksiyondan sonra sinyalin lokalizasyonu yeni polisakaritin birikme şeklini izlemeyi mümkün kılmaktadır. İlk çalışmada, kapsülü etiketlemek için bir MAb kullanmıştır. Bu stratejiyi kullanarak, çalışmacılar MAb etiketlemesinin kapsül kenarına kaydırıldığını tespit ederek polisakaritin kapsülün iç bölgesine eklendiğini ve eski polisakaritin dış bölgelere doğru yer değiştirdiğini ortaya koymuşlardır. Bununla birlikte, MAb'ın kovalent olarak polisakarite bağlanmadığı gerçeği, kapsül büyümesi sırasında MAb'nin konumunun sabit kalıp kalmamasına dair bir sorun ortaya çıkarmıştır. Bu sorunun üstesinden gelmek için başka bir çalışmada proteinler coğrafi belirteçler olarak kullanılmıştır. Antikordan farklı olarak, tamamlama proteini 3, kovalent bir tioester bağı ile kapsüle bağlanır ve sonuç olarak, kapsül kapsama büyütme sırasında yerine sabitlenmesi beklenmektedir [37].

Mikroorganizmalarda polisakarit biyosentezi, mikrobiyal hücre duvarlarının ve kapsüllerinin, antimikrobiyal ilaçların ve aşuların hedefleri olarak önemli roller oynaması nedeniyle, çeşitli mikrobiyal türlerde detaylı olarak incelenmiştir. Bakterilerde hücre çeperi, yapısal polimer peptidoglikanı plazma zarının dış tarafında polimerize edilir [44]. Bakteriyel kapsüller polisakaritler, aktif bölgeleri ekstratoplazmik ortama bakan plazma zarı glikosiltransferazları ile sentezlenir [43]. Mantarlarda, kitin ve glukan sentezlerinde, yapısal hücre duvarı polisakaritleri kitin ve glukanın sentezinden sorumlu olan enzimler, polisakarit polimerizasyonunun meydana geldiği fikrini destekleyen hücrel ekstretoplazmik bölgeler olarak plazma zarına sahiptir [33]. Özetle, mikrobiyal polisakaritlerin hücre dışı polimerizasyonu, farklı mikroorganizmalarının ortak bir özelliği gibi görünmektedir.

Kapsülün hücre duvarına sabitlenmesi, *C. neoformans*'ın patojenitesi için çok önemlidir, çünkü kapsül bileşenleri virülans için gereklidir. Kapsülün hücre duvarına takılmasından sorumlu olan bileşenler arasındaki etkileşimler yeterince anlaşılmamıştır, ancak polisakarit yüzey bağlantılarının karmaşık olduğu ve çok sayıda bileşen içerdiği konusunda artan kanıtlar vardır [31]. a-1, 3-Glukan, kapsül tutturma ile ilişkili ilk hücre duvarı bileşenidir [45]. Bozulmuş a-1, 3-glukan sentaz genlerine sahip kriptokokal hücrelerin normal düzeyde kapsül materyali sentezi vardır, ancak gözle görülür bir kapsül yoktur [31]. Ek olarak, glukanaz ile muamele edilmiş kapsüller olmayan hücreler, GXM'ye kusurlu bir şekilde bağlanmaktadır. Glukanlar ve GXM doğrudan bağlanabilse de, glukanlar ayrıca mantar hücresi duvarındaki diğer polisakaritler ve proteinleri de bağlayabilmektedirler. Glukan kaybı hücre duvarı düzenliğini bozabileceğinden, glukan bağlı hücre duvarı bileşenlerinin kapsül ile etkileşime girdiği hipotezi atılamaz. Aslında, a-1,3-glukan sentezine sahip olmayan mutant hücreler, hücre duvarı glukanlarının bulunmamasının

bu bölmedeki diğer yapısal bileşenlerin kaybına yol açabileceği fikrini güçlendiren hücre duvarlarına sahiptir [31].

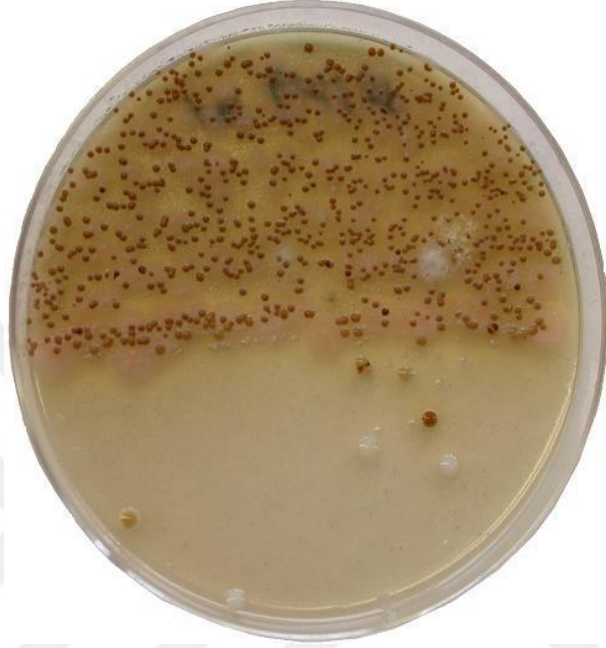
N-Asetilglukosamin veya bunun deasetillenmiş türevi, *C. neoformans* hücre duvarının montajında kilit rol oynar. Örneğin, kitin sentaz3 veya biyosentetik regülatör Csr2p'nin ekspresyonundan sorumlu genlerdeki mutasyonlar, virülansla ilişkili pigment melanini hücre duvarında tutma yeteneğini kaybetmiştir [46, 47]. Bu mutantlar ayrıca hücre duvarı melanin tutulmasını düzenlediği gösterilen kitosan sentezinde de kusurludur. *C. neoformans* kapsüller olmayan mutantlarının kitin hidrolizinden sorumlu enzim olan kitinaz ile muamele edilmesi, kapsüller bileşenlerin hücre duvarına dahil edilmesini engellemiştir. *C. neoformans*'ın kitinaz ile muamele edilmiş kapsüller olmayan mutantları hala çözülebilir polisakariti bağlamaktadır, ancak bunu hücre yüzeyinde gevşek bir polisakarit kat oluşumu ile sonuçlanan kusurlu bir şekilde yapmıştır. Bu bağlamda, kitin ile ilgili yapıların, *C. neoformans*'ın hücre duvarına bağlanan yapıda rol oynaması muhtemeldir. Aslında, hücre duvarı ile *C. neoformans* kapsülü arasında tekil yuvarlak veya kanca benzeri bağlantılar oluşturan kitosoligomerlerin varlığı yakın zamanda tarif edilmiştir. GXM'nin kitooligomerlere bağları dakiktir ve hücre yüzeyinin belirli bölgelerine, özellikle maya tomurcuklanmasına dahil olanlar için açıkça sınırlıdır; bu, kitin ile ilgili yapıların, hücre bölünmesi sırasında kapsül modellemesine dahil olduğunu düşündürmektedir. Bu gözlemler, hücre duvarı bileşenlerinin sentezinde beklenen rolüne ek olarak, kriptokoklardaki kitin metabolizmasının, kapsül sabitlemesine bağlanabileceğini göstermiştir [37].

Kapsül bileşenlerinin hücre duvarına sabitlenmesi, kapsül düzeni için çok önemlidir. Bununla birlikte, ortamda ilave interpolisakarit etkileşimlerinin gerçekleşmesi beklenmektedir. Her ne kadar kapsül genişlemesi polisakarit liflerinin uzamasıyla ilişkili olsa da ve kapsül boyutunun düzenlenmesi bireysel polisakarit molekülleri düzeyinde aracılık etse de, taramalı elektron mikroskobu görüntüleri, kapsül bileşenlerinin kendinden yapılabildiğini göstermektedir [48].

2.4. Melanin Yapı

Cryptococcus neoformans'ın belirleyici özelliklerinden biri fenolik bileşik içeren ortamda büyüdüğü zaman hücre duvarında koyu renk pigment sentezlemesidir. Bu koyu renk pigment negatif yüklü yüksek moleküler kütleli, hidrofobik, şekilsiz ve çözünmeyen bir bileşik olarak tanımlanmıştır. Melanin pigmenti mikroorganizma tarafından üretilmekte olup mikrobiyal patogeneze, malign melanom, parkinson ve vitiligo olmak üzere çeşitli hastalıklar ile karakterizedir [49, 50].

Bir maddenin siyah ya da kahverengi olması, sulu veya organik sıvılar içinde çözülüyor olması konsantre aside dayanıklı olması ve oksitleyici maddelerle ağartılmaya dayanıklı olması durumunda melanin olduğu kabul edilmektedir. Melanin üretimi ilk kez 1962'de *Guizotia abyssinica* tohum özleri içeren agar üzerinde kahverengi kolonileri gözlemleyen Staib tarafından tarif edilmiştir (Şekil 2) [51].



Şekil 2. *C. neoformans*'ın Staib Besiyerinde Melanin Pigmenti Oluşturması
[15 Eylül 2019 tarihinde [<https://www.slideshare.net/doctorrao/cryptococcus-neoformans-9872069> adresinden erişildi.]

C. neoformans'ta diğer *Cryptococcus* türlerine göre pigment üretimi daha hızlı ve daha belirgindir. *C. neoformans*ta melanin sentezi, dışsal dihidroksifenolik veya poliaminobenzen bileşiklerini, moleküler oksijeni gerektirirken demir, bakır ve glikoz seviyeleri de dahil çeşitli faktörlerle düzenlenmektedir [52].

Spesifik olarak bir fenoloksidazın etkisiyle Ito tarafından modifiye edildiği gibi Mason Roper modelini takip eden bir lakkaz, eksojen substratlara karşılık gelen kininlere oksitlenmekte ve ardından sıralı polimerizasyon yoluyla kendiliğinden yeniden düzenlenmeye tabii tutulur bu sırada melanomkrom ve en sonunda melanin oluşmaktadır [53].

İki ana melanin türü vardır. Birçok melanin bu iki pigmentin birleşiminden oluşmaktadır. Bunlardan ilki Eumelanin, bu yapı koyu kahverengi ile siyah bir pigmenttir. Bir diğeri ise Pheomelanin, bu yapının kırmızımsı ile kahverengi yapıda olduğu gözlenmiştir [54]. Kriptokokal

melanin üzerinde yapılan çalışmalarda %0.4 sülfür bileşimi ve %7.5'lik C/N içerdiği gözlenmiştir [55].

Melanin yapısı *Cryptococcus* enfeksiyonlarında virülansa dönüş, melanin üretiminin geri kazanılmasıyla ilişkilendirilmektedir. Zayıflatılmış virülansa sahip izolatlarda daha az polisakkarit kapsül yapısı ve daha yavaş büyüme oranı görülmüştür [56].

Lakkaz enzim spesifikliğınden sorumludur. Kriptokokal lakkaz 624 aminoasit ve 14 intron içeren glikosile edilmiş bir proteindir. Neoformans melaninlerinin çoğı Lac1 tarafından ifade edilmektedir [52]. Lac1'in bozulması kriptokokal virülansın önemli ölçüde azalmasına sebebiyet vermektedir. Bu enzimin hem membranda hem de çözünebilir kısımlarda olduğu tespit edilmiştir [57]. Antikordan lakkaza yapılan çalışmalarda ise enzimin hem hücre duvarında hem de sitoplazmada bulunduğu görülmüştür. Lakkaz hücrede farklı şekillerde lokalize olmuştur. Lac1'in hücre duvarında Lac2'nin ise sitoplazmik olduğu halde Misaal ve arkadaşları Lac1'in ortamdaki substrat ile karşılaşmasının daha muhtemel olduğu ve melaninin hücre duvarına biriktirilmesinden daha fazla taşınma gerektirmeyeceğı bir yerde olduğunu açıklamışlardır. Aynı grup Lac1 yokluğunda Lac2'nin ekspresyonu veya hücre duvarındaki boşluğu doldurmak için yeni bir protein ürünün üretilmesi nedeniyle hücre duvarı ve sitoplazmaya lokalize olabileceğini söylemiştir [37].

Lakkaz aktivitesi, l-epinefrinin melanine oksidasyonu yoluyla ölçülebilmekte ve Lac1 glikoz konsantrasyonu, sıcaklık, mevcut azot kaynağı, demir iyonu konsantrasyonu ve bakır konsantrasyonu ile düzenlenmektedir. *C. neoformans* lakkazının l-dopa ile tepkimesi oksijen tüketimiyle sonuçlanmaktadır. Glikoz açlığı ve düşük sıcaklıklar (37 ° C'ye karşı 25 ° C), enzim miktarını arttırmaktadır [57]. Lakkaz aktivitesinin 37°C'de düşmesi, memelilerin bir virülans faktörü için olağandışı görülebilmekte, ancak bu sıcaklıktaki azalmış aktivitenin, melanalizasyonda hiçbir farklılık tespit edilemediğinden, küçük biyolojik etkilere dönüşebilmektedir. 25°C ve 37°C'de üretilen *C. neoformans* lakkazı, elektroforetik mobilite ve konkanavalin A bağlanmasında farklılıklar gösterir [57]. *C. neoformans*'ın pigment üretme kabiliyeti aynı zamanda büyüme için sağlanan azot kaynağına da bağlıdır. Glutamin, asparajin ve glisin gibi amino asitler güçlü pigment sentezi indükleyicileridir. Laktamin aktivitesinde, glutamin ve (NH₄)₂S04'ü enzim aktivitesini artırma kabiliyeti ile biyokimyasal farklılıklar kaydedilmiştir. Glutamin, serotip B olanlar hariç tüm izolatlarda lakkaz aktivitesini baskılar [58].

LAC1 transkripsiyonu demire ve bakıra duyarlıdır ve her iki iyon da CCC2 ve ATX genlerinin yerleştirilme mutajenezi yoluyla gösterildiğı gibi melanizasyon için önemlidir [59]. Ek

olarak, bakır, bazı mutantlarda melanin eksikliği fenotipini bastırma yeteneğine sahiptir ve melanin düzenlemesine yardımcı olan bakır içeren veya nakil enzimi olan bir sinyal yolunda rol oynadığını göstermektedir. Bu, *C. neoformans*'ın virülans belirleyicilerinin uyumsuz bir düzenlemesi olduğu göstermektedir. Örneğin, demir gibi kapsüler polisakarit oluşumunu baskılayan uyarıcılar lakkaz aktivitesini arttırmaktadır [37].

Lakkazın enfeksiyon sırasında melanin ürettiği ve demiri okside ettiğine dair kanıtlar vardır [60]. Demir ayrıca melanine bağlanarak ve hücre dışı redoks tamponlama kapasitesini artırarak *C. neoformans* patojenitesini arttırabilir, böylece patojene oksidatif öldürmeye karşı daha iyi koruma sağlamaktadır [37].

Yüksek çözünürlüklü mikroskopi teknikleri, melanin granülü yaklaşık 40-130 nm çapında, kabaca benzer boyutlara sahip ayrı, küresel granüller tarafından oluşturulduğunu ve TEM analiziyle melanin granülü iki ila beş katmanlı bir eş merkezli düzende düzenlendiğini ortaya koymuştur. İlginç bir şekilde, tomurcuklanan hücrelerden izole edilen melanin granülü daha az melanine sahiptir, ancak ana hücreye göre tomurcuğun büyüklüğü arttıkça daha kalın bir melanin tabakası gözlenmiştir. Bu veriler, muhtemelen daha fazla melanin partikülü katmanı eklenerek melanin birikiminin yaşla arttığını gözlemlemesiyle tutarlıdır. Melanin oluşumu ana hücreden melanin türetmek yerine tomurcukta da görülür ve tomurcuklanan hücreler benzer şekilde kendi kapsüllerini oluşturmaktadır [61].

Ortamda melaninin, *C. neoformans*'ı, termo bozulma, radyasyon (UV, güneş, gama) ve ağır metaller (gümüş nitrat) dahil olmak üzere çeşitli gerilimlerden koruduğu düşünülmektedir [62].

C. neoformans'ın hidrolitik enzim sindirimine karşı koruma sağladığını gösteren in vitro çalışmalar tutarlıdır; ancak melanize edilmemiş *C. neoformans* hücreleri, hidrolitik enzimler tarafından bozulmaya karşı oldukça hassastır [63]. Tam koruma mekanizması belirlenmemiş olsa da melanin bozulmalarını önlemek için bazı hidrolitik enzimleri ve bunların alt tabakalarını bağlayabilmektedir [64]. Bu nedenle, melaninin kriptokok hücre duvarında biriktiği göz önüne alındığında, melaninin, hücre duvarı bileşenlerini, doğrudan hidrolitik enzimleri etkisiz hale getirerek ve/veya substratlarla bağlanarak ve mayayı enzimlerden koruyarak koruması mümkündür. Örneğin melanin, *C. neoformans*'ın aşırı sıcaklık, nem ve asitlik derecelerinde hayatta kalmasını kolaylaştırır. Ayrıca, melanin mayayı çeşitli radyasyon türlerine karşı korur [55]. Organizmanın olası ekolojik nişlerinden biri çürüyen ağaçlardır ve melanin üretimi *C. neoformans*'ın polifenol bileşiklerini parçalama kabiliyeti ile ilişkili olabilmektedir [37]. Melanize mantar türü, Çernobil'deki hasarlı reaktör gibi yüksek sabit radyasyon seviyelerine maruz kalan ortamlarda bulunmaktadır. Bu bulgu, nükleer reaktör havuz suyundaki bakterinin melanin üreten türlerin keşfedilmesine ve laboratuvar gözlemine uygun olarak, melaninin radyasyondan korumada rol oynadığını göstermektedir [65].

Melaninin mikrobiyal virülansa ve antimikrobiyal bileşiklere karşı klinik direncine katkısı geniş bir şekilde gözden geçirilmiştir [66]. Melanin, mantarı konak immün tepkisinden koruyan ve bir immünomodülatör olarak işlev gören önemli bir virülans faktörüdür [67]. Melanin, in vitro ve in vivo olarak fagositoza karşı *C. neoformans* direncini arttırmaktadır [68]. Melanin, mantar hücrelerini konakçı efektör hücrelerin ürettiği oksijen ve azot kaynaklı oksidanlara karşı koruma kapasitesine sahip güçlü bir antioksidandır [69].

Genetik çalışmalar, oksijene duyarlı mutantlar ile melanin üretemeyenler arasındaki bağlantıyı doğrularken, hücrel araştırmalar, melaninin *C. neoformans*'ı hem konakçı hücrelerden hem de oksijen azot kaynaklı oksidatif hasardan koruduğu hipotezini desteklemiştir [70].

Melaninin, immün yanıtlara müdahale ederek immünomodülatör bir bileşik olarak *C. neoformans* patojenitesine katkıda bulunduğuna dair önemli kanıtlar vardır. Melanin ayrıca *C. neoformans*'a karşı immün yanıtta da rol oynayabilmektedir, çünkü değişik derecelerde melanine sahip suşlar farklı miktarlarda tümör nekroz faktörü alfayı indükler ve farklı şekilde T-hücreli lenfoproliferasyonu uyarır [71]. Tamamlayıcı sistem, özellikle en iyi fagositoz ve mantar temizliği ile sonuçlanan polisakkarit kapsül üzerine C3 tamamlayıcı fragmanının biriktirilmesiyle kriptokokal enfeksiyonlara karşı dirençte kilit bir rol oynamaktadır. Melaninler, tamamlayıcıyı aktive etme kabiliyetine sahip olmalarına rağmen, kriptokok hücre duvarında bulunmakta ve bu nedenle, çevreleyen polisakkarit kapsülü nedeniyle hücre dışı ortama önemli ölçüde maruz kalmaları muhtemel değildir [37].

Bu nedenle, melaninin, kapsül küçük olmadıkça veya belirgin bir şekilde bozulmadıkça, *C. neoformans* enfeksiyonu sırasında kompleman sisteminin bileşenleri ile etkileşime girmesi imkansızdır [72]. Melanize *C. neoformans* hücreleri, antifungaller amfoterisin B ve caspofungine karşı melanize edilmemiş hücrelere göre daha az hassastır. Amfoterisin ve caspofunginin, mantar belirtecine maruz bırakılmadan önce melanin ile inkübe edilmesi, antifungal aktivitelerini *C. neoformans*'a karşı antifungal aktivitelerini önemli ölçüde azaltırken, itrakonazol, flukonazol ve flusitozin inkübasyonunun antifungal etkinlik üzerinde etkisi olmamıştır [73]. Ayrıca, melanin granülleri arasındaki sıkı boşluklar, amfoterisin B (moleküler kütle, 924 g / mol) ve caspofungin (molekül kütlesi, 1.093.5 g / mol) gibi büyük ilaçların *C. neoformans* hücrelerine girmesini engelleyebilmektedir [66]. Melanin, *C. neoformans*'ın hayatta kalmasına ve patogeneze katkıda bulunan birçok hayati rol oynar ve maya hücrelerinin akciğerden beyine yayılması için lakkaz gerekmektedir. Ancak, melanizasyon süreciyle ilgili detaylarda hala bazı eksiklikler vardır.

2.5 Hücre Duvarı

Mantar hücre duvarları, temel olarak polisakaritler, proteinler, mannopteinler ayrıca lipitler, pigmentler ve inorganik tuzlar dahil olmak üzere farklı bileşenlerden oluşmaktadır. Temel çerçeve genel olarak korunmakla birlikte, polisakaritler hücre duvarının yaklaşık %80-90'ını oluşturmaktadır olup, mantar krallığı arasında önemli bir çeşitlilik vardır. Yaygın olarak hücre duvarı yapısında glukoz (α ve β -glukan), mannoz (proteine bağlı N ve O bağlantılı mannan) ve N-asetilglukosamin (kitin) polimerleri bulunmakta ve hücre çeperinin sentezi ve bakımı çok sayıda biyosentetik ve sinyalleşme yolu içermektedir [38].

Cryptococcus'un hücre duvarının biyokimyasal analizi, hücre duvarının dış tabakası ile bağlantılı olan ekzopolisakarit kapsülünün varlığı ile karmaşıklaşmıştır. Çok bol miktarda bulunan kapsüller glukuronoksilomannan ve galaktoksilomannan polimerleri, hücre çeperi ile birleşir ve standart polisakarit analizine müdahale etmektedir. Bu sorunun aşılması ve hücre duvarı kompozisyonunu tanımlamak için *cap67Δ* ve *cap59* gibi kapsülü olmayan suşlar kullanılmıştır [74]. Bu çalışmalar kriptomikal hücre duvarının α -1,3-glukan,-1,3- ve β -1,6 bağlantılı glukanlar ve kitin içerdiğini ortaya koymuştur. Bu çalışmalara dikkat çekilmesi, kapsülü olmayan mutantlardaki kusurların iyi tanımlanmadığından, kapsül olmayan duvarın vahşi tip *C. neoformans* duvarı için iyi bir model olduğu açıkça tespit edilmemiştir. Ek olarak, *C. neoformans*, bitkisel hücre duvarı kitinin etkisiz hale getirilmiş türeviden olan kitosanı önemli miktarda içermektedir [75].

Monosakarit analizi, glukoz ve N-asetilglukozamin / glukozaminin, sırasıyla %86 ve %7.3 oranında saflaştırılmış hücre çeperleri içeren iki birincil şeker olduğunu belirlemiştir [74]. Kriptomikal hücre duvarının ayrıca mannopteinler, lipitler ve pigment melanin dahil olmak üzere polisakarit olmayan bileşenler içerdiği gösterilmiştir.

Çoğu hücre çeperi polisakariti, plazma zarında bir sentaz proteini ile sentezlenmektedir. Bu enzimler, sitoplazmada bulunan nükleotid, şeker alıcılarından şeker monomerlerinin değişimini katalize etmek için alanlar paylaşan mantarlar arasında yüksek oranda korunmaktadır. Oluşan zincir uzadıkça, diğer hücre duvarı bileşenleri ile son bağlanma için sentaz proteini tarafından oluşturulan plazma membranında bir gözenek içinden geçirilmektedir.

2.5.1 α -1,3-glukan

Hem patojenik hem de patojenik olmayan birçok *Cryptococcus* türünün hücre duvarlarında α -1,3-glukan bulunduğu gösterilmiştir [74]. İmmünoelektron mikroskopi çalışmaları, öncelikle dış hücre duvarına α -1,3-glukanı lokalize etmiştir. Polimere serpiştirilmiş baskın bağlanma glikozları için α -1,3-glukan olarak adlandırılırken, bağlantıların yaklaşık % 3'ü α -1,4'tür [74].

2.5.2 β -1,3-glukan

S. cerevisiae ve diğer ascomycetous funguslarında β -1,3-glukan majör yapısal bir bileşen olup toplam hücre duvarı kütesinin %30 ila %60'ını içeren en bol β -glukandır [76, 77]. Bu yüzde *C. neoformans*'ta belirgin derecede düşüktür [74].

Bununla birlikte, *C. neoformans*, β -1,3-glukan inhibitörlerine karşı daha az hassastır [78]. Bu duyarlılık eksikliğini açıklamak için literatürde birkaç hipotez öne sürülmüştür. Bir olasılık, *C. neoformans*'ın duyarlı ascomycetlerden daha az β -1,3-glukan içerdiğinden, sentezini bloke etmek yeterince zarar vermez. Thompson ve diğ. *C. neoformans*'ın tek bir FKS1 genine sahip olduğunu ve bunun silinmesinin yaşayabilirlik kaybına neden olduğunu bulmuştur [79].

2.5.3 Kitin / Kitosan

1,-1,4-bağlı N-asetilglukosaminin (GlcNAc) bir homopolimeri olan kitin, kabukluların kabuğunda ve neredeyse tüm mantarların hücre duvarlarında ve doğada en bol bulunan polimerlerden biridir. Kitin zincirleri H + yapıştırma yoluyla mikrofiber brilyalar halinde düzenlenmekte ve böylece hücreye mükemmel bir güç ve sağlamlık kazandırmaktadır [80].

Kitinin etkisiz hale getirilmiş şekli olan kitosan, genellikle doğada, kitinden daha az miktarda olup birçok mantar türünün hücre duvarında bulunmaktadır. *S. cerevisiae* ve diğer ascomycetes'ler, askosfer duvarında sadece kitosan içermektedir [81]. Bu nedenle, ilk kitosan üretimi çalışmaları, hücre duvarı kitosanın önemli seviyelerini üreten *M. rouxii* kullanılarak yapılmıştır [82]. Kitosan, N-asetilglukozaminin glukozamine CDA'lar tarafından enzimatik dönüşümü yoluyla kitinden elde edilmektedir [83]. Büyüme evresindeki *Cryptococcus* hücreleri, kitinin > %65'ini deasetilat etmektedir [84].

Melanin pigmenti, hücre çeperi ile bağlantılı bir kriptokokal virülans belirleyicisidir. Melanin üretemeyen *C. neoformans* suşları, virülansı ve makrofajlar tarafından fagositoza uğrama

oranını azaltmıştır. Melanin immünojeniktir ve hücre duvarındaki varlığı, büyümeyi önleyen antikörlerin üretilmesini sağlamaktadır. Melanize hücreler, antifungallere karşı artan bir dirence sahiptir. Melanin sadece enfeksiyonda değil, aynı zamanda çevrede de önemli fonksiyonlara sahiptir. Toksinler, aşırı sıcaklık ve UV de dahil çevresel strese karşı korunma için kritik öneme sahip olup redoks tamponu olarak işlev görerek oksidanlara karşı koruma sağlamaktadır [85].

Melanin, lakkazın etkisiyle üretilmektedir. *C. neoformans* genomu, iki glikoz içermekte olup bunlar; LAC1 ve LAC2'dir. İlki glukoz açlık koşulları altında baskın aktiviteye sahip olan bir hücre duvarı ile ilişkili enzimi ifade eder [86]. *C. neoformans* melanininin yapısının fenol ve indolün çapraz bağlı polimerleri olduğu düşünülmektedir. Melanin hücre duvarı polisakaritlerine veya proteinlerine çapraz bağlanabilen oldukça kararlı bir ağ oluşturmak için hücre duvarında biriktirilmektedir. Melanin, sitoplazmayı, lipidleri ve proteinleri gideren sert kimyasal işlemlere dirençli olup, hücre şeklini koruyan melanin "hayaletlerinin" üretilmesine neden olmaktadır. Bu melanin hayaletleri taramalı ve transisyonel elektron mikroskobu, atomik kuvvet mikroskobu ve nükleer manyetik rezonans ile kapsamlı bir şekilde analiz edilmiştir [87]. Bu araştırmalar, melaninin, hücre duvarında, 40 ila > 100 nm arasında değişen ve 10 ila 300-diameter çaplı gözenekler içeren yoğun paketlenmiş granüllerin konsantrasyon katmanlarında biriktirildiğini ortaya koymuştur. Yaşla gözenekler azalırken melanin tabakasının kalınlaştığı görülmüştür [87].

Kapsülü olmayan ve kapsüllenmiş kriptokok hücrelerinin transmisyon elektron mikroskobu ile incelenmesiyle hücre duvarında zara bağlı veziküllerin varlığı ortaya çıkarılmıştır. Bu veziküller, kapsül bileşeni olan glukuronoksilomannan, proteinler, pigmentler (melanin) ve glukosilseramid dahil olmak üzere çeşitli yapıları içerir. Melaninin, daha sonra hücre duvarına hapsolmuş ve küresel melanin granüllerini üreten bu veziküllerin içinde sentezlendiği varsayılmıştır [38]. Hücre duvarı bir zamanlar katı, statik bir yapı olarak görülmesine rağmen mevcut görünümü, yüksek dereceli hücresel yapıların büyümesini, bölünmesini ve gelişimini hesaba katarak yeniden düzenleyen dinamik bir organeldir. Bazı hücre duvarı bileşenleri, çeşitli dış koşullara yanıt olarak yukarı veya aşağı doğru düzenlenebilmektedir. Mantar hücre duvarı birkaç farklı bileşen içermekte olup yapıları ve sentez mekanizmaları hakkında çok şey anlaşılmaktadır. Bununla birlikte, bu bileşenlerin nasıl yeniden düzenlendiğini ve birbirine nasıl bağlandığı henüz tam anlaşılamamıştır.

Hücre duvarı düzenlemesi, bitkisel büyüme sırasında tomurcuklanma ve hifler gibi karmaşık çiftleşme yapılarının oluşumu için esastır. *S. cerevisiae* ve diğer mantarlarda kitinaz tomurcuk oluşumu için esastır ve cinsel üremeye katılmaktadır. *Cryptococcus*, dört kitinaz genini ve bir tek N-asetilheksosaminidazı (HEX1) kodlar. İlginçtir ki dört kitinaz geninin ya da üçünün

HEX1 ile kombinasyon halinde silinmesi, *Cryptococcus*'un cinsel gelişimini engellemesine rağmen, aseksüel büyümeyi olumsuz etkilememiştir [88]. Bu veriler, *C. neoformans*'da tomurcuklanma sırasında hücre duvarının yeniden yapılanma mekanizmasının diğer mantarlardan çok farklı olduğunu göstermektedir.

2.5.4 Fosfolipaz B1

Hücre dışı proteom analizinde tespit edilmeyen birkaç şifreleme proteini de hücre duvarında lokalize edilmiştir. Bu protein virülans faktörü olan Plb1'dir [89, 90]. Plb1, memeli plazma membranında ve pulmoner yüzey aktif maddede bulunan fosfolipidleri hidrolize edebilmektedir ve konakçı akciğer dokusunun istila edilmesi ve enfeksiyonun yayılması için gereklidir [89, 90]. Plb1'in hücre duvarında yoğunlaşmış olup hücre yüzeyinden salgılanan kriptokokal plazma zarında bulunmuştur [91].

2.5.5 Lakkaz

C. neoformans hücre duvarındaki bir başka önemli protein, melanin pigmentinin üretiminden sorumlu iki enzimden biri olan lakkaz 1'dir (Lac1). Lakkaz ayrıca normalde makrofajların fagolizozomunda biriken toksik demir bağımlı fenton ürünlerinin oluşumunu da önler, bu da makrofajlar içindeki *C. neoformans*'ın hayatta kalmasında lakkaz için olası bir rol olduğunu göstermektedir. Lakkaz, virülans için açıkça önemlidir. Bir Lac1 suşu, intravenöz bir fare enfeksiyon modelinde virülansı hafifletmiştir [92].

C. neoformans ayrıca, bazı kanonik olmayan proteinlerin kriptokok hücre duvarında bulunmasına rağmen, birçok mantar türünün hücre duvarlarında kolayca bulunan PIR protein sınıfına yönelik belirgin homologlardan yoksundur. Hücre duvarının temel bileşiminin ötesinde, diğer belirgin özellikler arasında melanin biriktirme kabiliyeti, kapsüler polisakaritler ile birleşme ve gözle görülebilir tomurcuklanma için gerekli olan kitinazların gerekliliği sayılabilmektedir [37].

2.6. MAT Lokusu

Mantarlarda seksüel üreme, hücre tipi kimliği, hücre hücre füzyonu ve zigotu düzenleyen çiftleşme tipi (MAT) lokusu olarak bilinen genomun özel bir bölgesi tarafından yönetilmektedir. Biprotlarık mantarlarda iki cins cinsiyet vardır; bipolar ve tetrapolar. Bipolar türlerde cinsiyet, genellikle biallelik olan tek bir MAT lokusu tarafından yönetilirken, tetrapolar türlerde, genellikle çok alelikli olan iki bağlantısız MAT lokusu, cinsel üremeyi koordine

etmektedir [120]. Bu genomik bölgenin fungal biyolojide türlerin kimliği ve başarısındaki merkezi önemine rağmen, filum içindeki türler arasında önemli ölçüde farklılık göstermektedir. Genel bir prensip MAT lokusu DNA bağlanma transkripsiyon faktörleri ile kodlamaktadır ve bazidiomycetlerde MAT lokusu feromonları ve feromon reseptörlerini de kodlanmaktadır [37].

Son zamanlarda yapılan araştırmalar, mantarlarda ve cinsiyet kromozomlarında MAT lokuslarında muazzam plastisite ve metazoanlarda fonksiyonlarını ortaya koymaktadır. *Cryptococcus neoformans* ve *Cryptococcus gattii*, insanlarda ve hayvanlarda zatürree ve menenjitte neden olan basidiomycet maya patojenleridir. Her iki türün de **a** ve α hücrelerini içeren bir bipolar çiftleşme sistemine sahip olduğu bilinmektedir.

C. neoformans serotip A ve *C. gattii* popülasyonlarının benzersiz bir özelliği, klinik ve çevresel izolatların büyük çoğunluğunun (> A serotipinde >%99.9), **a** çiftleşme tipinin popülasyonun ~% 10'unu oluşturduğudur. Afrika'daki Sahra altı bölgesinden izole edilen popülasyon dışında, oldukça nadir görülmektedir [121].

Klinik ve çevresel izolatlar arasında α ve **a** hücrelerinin prevalansı arasındaki şiddetli çarpılma, MAT α hücrelerinin bazı koşullar altında MAT**a** hücrelerine göre daha uygun olabileceği hipotezine yol açmıştır. Kongenik **a** ve α suşlarını karşılaştıran virülans çalışmaları yapılmıştır. Her iki serotip D JEC20 / JEC21 ve NIH433**a** / NIH433 α arka planlarında, **a** hücreleri bir hücreden daha virülenttir [122]. Bununla birlikte, D B-3501 serotipinde, kongenik suşlar (B-3501**a** / B-3501 α) eşit derecede virülenttir. Kongenik serotip A suşu H99 (MAT α) ve KN99**a** suşu arasında virülansta bir fark gözlenmemiştir, ancak iki suş farelere koinfekte edildiğinde, **a** hücreleri, merkezi sinir sistemine girmek için kan-beyin bariyerini geçme konusunda daha büyük bir yetenek göstermiştir [123]. Ek olarak, monokaryotik meyvelerden geçme yeteneğinin ise α hücrelerine bağlı olduğu gösterilmiştir [37].

Çiftleşme tipi, virülans ve gelişme arasındaki ilginç bağlantılar, MAT lokusunun moleküler doğasına olan ilgiyi yoğunlaştırmıştır Moore ve Edman, diferansiyel klonlama ile α tipine özgü ~ 35 ila 45 kb'lik bir bölge belirlemişlerdir, bu da MAT'in diğer bilinen mantarlara kıyasla *C. neoformans*'da genişlediğini göstermiştir [124]. Bu lokus içerisindeki çiftleşmeyle ilgili genleri tanımlamak için, alt klonlamadan türetilmiş çeşitli fragmanlarla hücrelerin transformasyonu ve **a**-hücrelerinde konjugasyon tüpü oluşumunu indüklediği 2.1 kb'lik bir bölgenin olduğu bulunmuştur. Dizi analizi, bir açık okuma çerçevesinin diğer mantar feromon öncülleri ile benzerlik paylaştığını ortaya koymuştur [124]. Bu gen, MFa1'dir ve MAT lokusunda tanımlanan ilk gen olmuştur. Diğer karakterizasyon, STE11, STE20 ve STE12 içeren mitojenle aktive olan

protein kinaz (MAPK) sinyalleşme katılan genlerin, ~ 50 kb'lik bir MAT bölgesine gömülü olduğunu ortaya çıkarmıştır [125]. İki ilave feromon geni, MF α 2 ve 3, feromon reseptörü CPR α (STE3 α) ve bir MAT α 'ya özgü miyosin geninin, MAT lokusunun, *C. neoformans*'da en az ~ 50 kb'ye çıkmış olduğu bulunmuştur [125].

SXI1 α 'nın keşfi (~ 55 kb) daha önce tanımlanmış olan MAT lokus bölgesinden, ya SXI1 α 'nın ikinci bir MAT lokusunu temsil ettiğini ya da MAT büyüklüğünün beklenenden daha büyük olduğunu öne sürmüştür. MAT'ın tam moleküler yapısını belirlemek için, Lengeler ve ark. MAT lokusunu, JEC20 (**a**) ve JEC21 (**α**) serotipinden ve H99 (**α**) ve 125.91 (**a**) serotipinden A suşlarından klonlanmış ve dizilmiş nükleotit sekansı ve sinten analizlerine dayanarak, MAT büyüklüğünün ~ 105 ila ~ 130 kb arasında olduğu ve *C. neoformans*'ın MAT lokusunun, tipik olarak bilinen diğer birçok fungal MAT lokusuna kıyasla çarpıcı şekilde genişlediğini gösterir [120].

Tüm MAT lokusu, genetik bir haçta tek bir birim olarak kalıtılır, bu, kendi kendine doğurgan ve steril bir soy oluşmasını önleyen cinsiyet belirleyici bölgelerin kilit bir özelliği olan rekombinasyonun lokus boyunca bastırıldığını gösterir [37]. Ayrıca MAT, 10 geri çapraz dizisinde stabil bir şekilde kalıtsaldır, çünkü orijinal ebeveynler ile 10 geri çaprazdan türetilen soy arasında Southern blot analizinde bir fark gözlenmedi ve aynı zamanda rekombinasyonun bu bölgede bastırıldığı fikrini destekledi [37].

Bu genişletilmiş MAT lokusunun gen içeriği nedir? Dizi analizleri, bu lokasyonda ~ 25 genin, ~%50 MAT içeren kodlandığını ortaya koydu. Çoklu transpozon kalıntıları ve tekrarlayan diziler de hem a hem de allellerde bulunur [37]. MAT'ta kodlanan genler arasında, homeodomain proteinleri ve feromon / reseptör (P / R) genleri, *Ustilago maydis* gibi tetrapolar bazidiomycetlerde evrensel olarak bulunan cinsiyet kimliği için beklenen merkezi regülatörlerdir. Tetrapolar mantarlarda, bağlanmamış iki MAT lokusundan biri homeodomain proteinlerini kodlar ve diğeri feromonları ve feromon reseptörlerini kodlar. Cinsiyet belirleme için kritik olan bu bileşenlere ek olarak, eşleşmede rol oynayabilecek birkaç gen de loküse dahil edilmiştir. Örneğin, feromon sinyalleşmesinde yer alan STE20 **a/ α** , STE11 **a/a** ve STE12 **a/ α** ve SPO14, RUM1 ve BSP1 mayoz veya sporülasyona katılabilir. CID1, *Schizosaccharomyces pombe*'da S-M kontrol noktası kontrolü için gerekli olan bir proteindir [126].

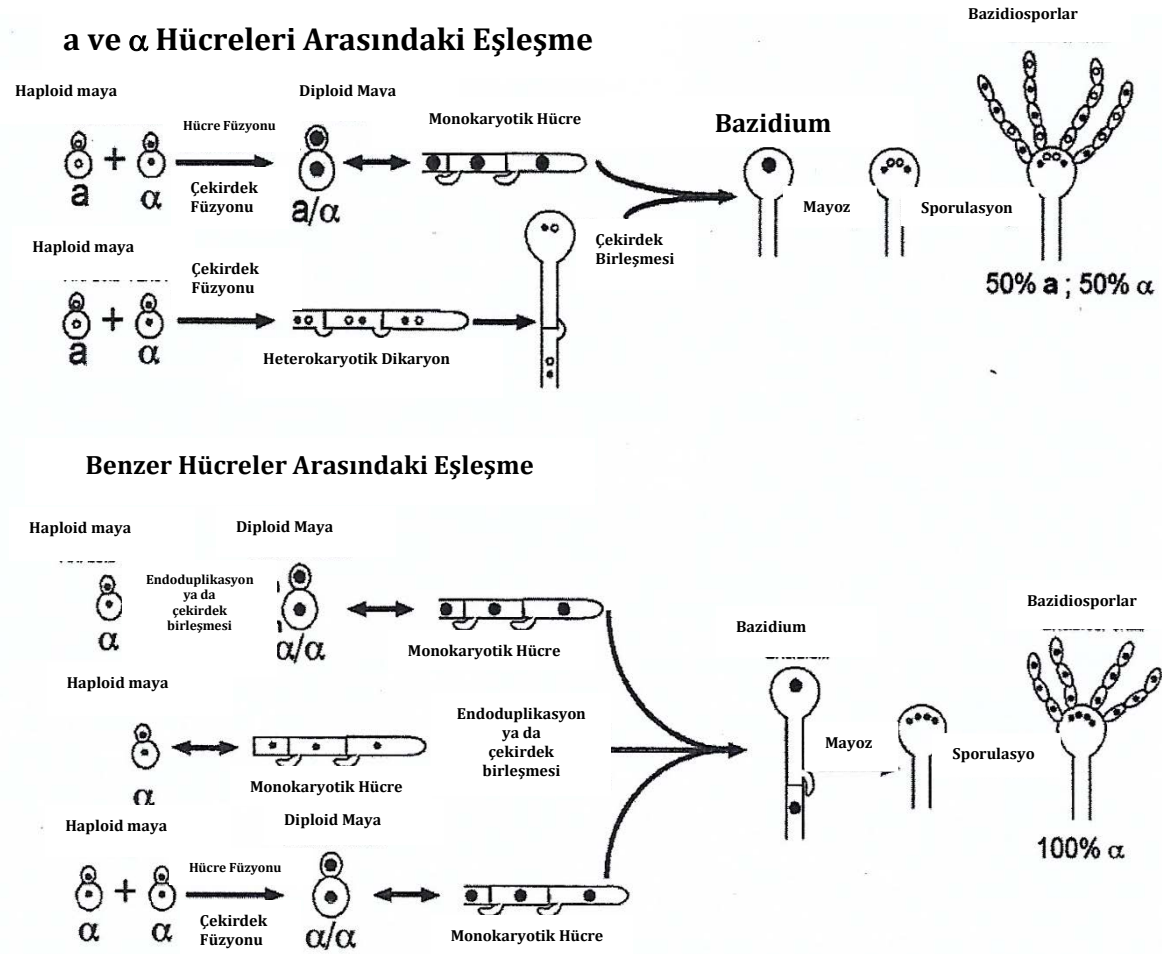
Farklı serotipler ve çiftleşme türleri arasındaki gen içeriği, benzer bir atadan ayrıldıklarını düşündüren oldukça benzerdir. Bununla birlikte, gen düzeni, farklı çiftleşme türleri, çeşitleri ve kardeş türleri arasında daha uzun mesafelerde tutulduğu MAT dışındaki dizilerin aksine geniş bir

düzenlemeye tabi tutulmuştur [37]. İstisnalardan biri, MAT lokusunun ayrılmaz bir parçası olmak yerine, her iki bölgedeki **a** allelini sabitleyen gen dönüşümünün neden olduğu, serotip D soyunda, yan bölgede üç genin (IKS1, BSP3 ve NCM1) mevcut olmasıdır. Çiftleşme türleri, atalardan bir alel kaybıyla sonuçlandı ve sonuç olarak bu genleri MAT'tan çıkardı [37].

Üç *Cryptococcus* soyunda MAT genlerinin filogenetik analizleri, MAT lokusunun genlerinin dört farklı tabakaya sınıflandırılabilceğini göstermiştir. İlk kategori, feromonlar ve feromon reseptörleri gibi genleri ve MAPK sinyal yolunda yer alan genleri içeren “eski sınıftır”. Çiftleşme türüne özgü bir düzende kümelenirler. “Orta I” ve “orta II” olarak adlandırılan ikinci ve üçüncü kategoriler, aynı zamanda bir eşleşme türüne özgü bir düzende kümelenen genlerdir, ancak iki eşleşme türünün alelleri daha yüksek bir benzerlik yüzdesini paylaşır; bu nedenle, iki allel arasındaki filogenetik desen eski sınıf kadar farklı değildir. Son kategori, türe özgü bir filogenetik örüntü sergileyen genlerden oluşan “yakın sınıf”dır ve **a** ve **α** alelleri arasındaki dizi%90'dan fazla nükleotit kimliğini paylaşır. MAT genlerinin filogenetik ağaçlarının farklı desenleri evrimsel kökenlerini yansıtır ve bu genlerin evrimin farklı zaman noktalarında kademeli olarak elde edildiğini gösterir [37]. Bu analizler, *Cryptococcus* MAT lokusu için bir model önerisine yol açmıştır. Fraser ve diğ. bu alışılmadık şekilde büyük MAT kümesinin, bir lokusun homeodomain protein transkripsiyon faktörlerini kodladığı ve diğerinin feromonları ve feromon reseptörlerini kodladığı bir atalara ait tetrapolar sistemden geliştiğini ileri sürdü. İki ataların bulunduğu yer bir dizi gen edinimi ile genişledi ve bir kromozomal translokasyon gerçekleşti ve iki kümeyi bir çiftleşme tipinde bir bitişik MAT aleline birleştirdi. Bu geçiş aşamasında, alellerden biri, bağlanmamış iki MAT lokusundan bir tek MAT lokusuna geçişi tamamlarken, diğeri hala bağlanmamış iki MAT lokusu sergiler. İkinci alel iki MAT LAC1'nin birbirine paralel rekombinasyon yoluyla füzyonu yapıldığı zaman bipolar duruma daraltılmış olan bu geçişli eşleşme durumunu "tripolar" olarak adlandırılmıştır [37].

2.7. Üreme Yapısı

Cryptococcus neoformans ve *Cryptococcus gattii*, otuz yıldan uzun bir süredir bilinen bir seksüel döngüye sahiptir [93]. Her iki türde, çiftleşme tipi (MAT) lokusu tarafından düzenlenmekte olup bipolar çiftleşme sistemine sahiptir ve çiftleşme, karşıt çiftleşme tipindeki (**a** ve **α**) hücreleri arasında gerçekleşmektedir (Şekil 3).

Şekil 3. *Crptococcus* Üreme Yapısı (MAT)

a ve **α** haploid maya hücreleri, besin sınırlayıcı koşullar altında **a-a** hücre hücre füzyonunu tetikleyen peptid feromonları salgılamaktadırlar. Füzyondan sonra, hücreler filamentli büyümeye geçerek iki çekirdekli birleşme oluşmaktadır, ancak ortaya çıkan dikaryotik hifada kaynaşma gerçekleşmemektedir. Kelepçe hücreleri, iki çekirdeğin hifal büyüme sırasında tam olarak ayrıldığından emin olmak için oluşturulmaktadır. Blastosporlar (maya benzeri hücreler) hifadan tomurcuklanabilmekte ve mitotik olarak bölünebilmektedir. Bazı hifal hücreler de büyüyüp klamidiosporları oluşturabilir. Bazidiumda, iki çekirdek (**a** ve **α**), dört bazidiospor zinciri oluşturmak için kaynaşır ve mayoz oluşturur. Hücre füzyonunun hemen ardından **a** ve **α** haploid maya hücreleri arasındaki nükleer füzyonun takip edildiği durumlarda, heterozigos diploid **a / α** maya hücreleri oluşturmaktadır. Bu diploid hücreler

kaynaşmamış kelepçe hücreleri ile monokaryotik hifa üretmektedir. Sonunda da basidiumda mayoz ortaya çıkar ve **a** ve **α** çiftleşme tiplerine sahip basidiosporlar üretilmektedir (Şekil 3).

Aynı cinsiyette çiftleşme sırasında ise bir çiftleşme tipindeki hücreler, endoduplikasyon veya hücre-hücre ve nükleer füzyon ile diploid hale gelmektedir. Diploid monokaryotik hifa, önceki hücreye kaynayan ilkel kelepçe bağlantıları oluşturmaktadırlar. Blastosporlar ve klamidosporlar da meyvelerde üretilmektedirler. Ardından basidiumda mayoz gerçekleşip haploid bazidiosporlar dört zincir halinde üretilmektedir. Alternatif bir modelde, haploid **α** hücreleri, haploid çekirdekli monokaryotik hifa üretir ve diploidizasyon, basidiumda meydana gelmekte ve bunu takiben sadece **α** ya da sadece **a** çiftleşme tipine sahip sporlar üretmek için mayoz bölünme gerçekleşmektedir (Şekil 3).

1966'da Shadomy ve Utz, sarkoidozu olan kriptokokal selülit ve osteomyeliti olan bir hastadan izole edilen bir *C. neoformans* (Coward suşu = NIH12) suşunda hiphal oluşumunu bildirmiştir. İlk olarak, türün *Cryptococcus* cinsinin hiphal yokluğundan dolayı o zamanki tanı kriterlerinden biri olan *C. neoformans*'ın hif oluşturucu bir mutan olduğunu varsayımlardı. Daha sonra, Shadomy, NIH12 suşu da dahil olmak üzere iki *C. neoformans* suşu tarafından oluşturulan hiphada bazidiomiçet mantarların bir özelliği olan kelepçe bağlantılarını gözlemledi [37].

Kwon-Chung kelepçe bağlantısının, Bazidiomiçetlerin bir özelliği olduğunu ve yalnızca *C. neoformans*'ın nadir görülen suşlarının katı besiyerinde hif ürettiğini ve *C. neoformans*'ın seksüel döngüsünü tamamlamak için cinsel açıdan uyumlu suşlarla çiftleşmeyi gerektiren heterotallik bir bazidiomiçet olabileceğini belirtmiştir [37].

Çiftleşme için uyumlu soyların var olup olmadığını belirlemek amacıyla, NIH12 suşu (serotip D) çoğunlukla çevresel kökenli olan ve rastgele seçilen 20 serotip D suşu ile çaprazlanmıştır. Test edilen 20 suştan, ikisi güvercin dışkılarında elde edilmiş NIH430 ve NIH433 olup NIH12 ile çiftleştirilmiş ve bilinmeyen bir teleomorf üretmiştir. Kalan 18 suş da, NIH433 ve NIH430 ile başarılı bir şekilde eşleştirilmiştir ve bu zıt çiftleşme tiplerinin kayda değer bir oranını ortaya koymuştur. Bu 20 suş ile çiftleşme sonuçlarına dayanarak, *Filobasidiella neoformans*, *C. neoformans*'ın cinsel durumu olarak tanımlanmıştır. *Filobasidiella* cinsini, Basidiomycota'nın diğer üyelerinden ayıran özelliği, flask-şekilli ince holobasidia'nın tepesinde dört adet uzun baziptal küçük bazidiosporun (1.8-2.5 inm çapında) zincirlerinin oluşmasıdır [94].

Bazidiospor zincirleri, dört bölgeden basidianın zirvesinden tekrarlanan tomurcuklanma ile üretilmekte ve her bir bazidiospor, postmiyotik mitozun bir ürünüdür [94].

Cinsel üreme genetik olarak farklı cinsiyetler arasında çiftleşme tipi lokusu (MAT) ile genetik olarak düzenlenir bu bölge genellikle idiomorf veya alleler arasındadır. MAT'ın moleküler yapısı ilk defa, tomurcuklanan maya *Saccharomyces cerevisiae*'de belirlenmiştir. *S. cerevisiae*'da, hücre tipine özgü genlerin ekspresyonunu yöneten transkripsiyonel aktivatörleri ve baskılayıcıları kodlayan **a** ve **α** olmak üzere iki farklı MAT aleli görülmüştür [37]. Alfa hücrelerinde **α** domain transkripsiyon faktör **α1**, **α** spesifik genin aktivasyonunu eksprese ederken **α2** ise **a**-spesifik genlerin (asg) ekspresyonunu baskılar. **a** hücrelerinde, **a** bölgesi transkripsiyon faktörü **a1**, **a**-spesifik genlerin (asg) ekspresyonunu etkinleştirmek ve **a**-spesifik genlerin (asg) ekspresyonunu baskılamak için homeodomain transkripsiyon **a2**'nin aktivasyonundan sorumludur. Bir hücrede asgs, homeodomain transkripsiyon faktörü **a1**'in bağımsız olarak ifade edilir ve şimdiye kadar, bilinen hiçbir haploide spesifik fonksiyon **a1**'e tanımlanmadı. Hem **a** hem de **α** hücreleri, uygun koşullar altında mayoz geçiren üçüncü hücre tipi olan **a** / **α** diploidleri oluşturmak için çiftleşme yeteneğine sahiptir. Diploid hücrelerde, homeodomain proteinler **a1** ve **α2**, haploid-spesifik genlerin ekspresyonunu bastırmaya ve mayoz ve sporülasyonu yöneten genlerin ekspresyonunu desteklemeye yarayan bir heterodimer oluşturmaktadır [37].

Ascomycete soyundaki türlere ek olarak, MAT lokusları Basidiomycota'da ve daha yakın zamanda, mantarlarda bir bazal grup olan Zygomycota'da tanımlanmış ve karakterize edilmiştir [98]. MAT'ın gen içeriği türler arasında değişir; bununla birlikte homeodomain, **α**-domain veya High-Mobility Group (HMG) alanlarını koruyan transkripsiyon faktörlerinin, MAT lokusu tarafından kodlanması ve cinsel üremeyi yönetmek için ana düzenleyiciler olarak işlev görmesidir.

C. neoformans, **a** ve **α** olmak üzere iki çiftleşme tipini içeren iki kutuplu bir çiftleşme sistemine sahiptir. MAT lokusu tarafından kodlanan ~ 20 gen arasında, homeodomain proteinleri **Sxi1α** ve **Sxi2a**, hücrelerin cinsel kimliğini sağlayan anahtar düzenleyicilerdir [95]. MAT lokusu ilk önce genomdaki 50 kb'lik bir alanı kapsayacak şekilde tanımlanmıştır; ancak bu tanımlanan **MATα** bölgesini diploid hücrelerde silmek, **a** / **α** hücre kimliğini ortadan kaldırmamıştır.

C. neoformans, doğada ağırlıklı olarak haploittir ve beslenme sınırlandırmasına veya spesifik sinyallere cevap olarak cinsel üreme (çiftleşme ve mayoz) meydana gelmektedir. Bu, tipik olarak doğada diploid olan *S. cerevisiae*'nin tam aksinedir. *S. cerevisiae*'de bol miktarda besin varlığında haploid izolatlar arasında eşleşme olmaktadır, oysa mayoz azot sınırlaması ve asetat varlığı ile tetiklenmektedir. Ek olarak, ışık ve sıcaklık gibi diğer çevresel ipuçları da *C. neoformans*'ın çiftleşmesini etkilemektedir [37].

C. neoformans'ın seksüel döngüsünün keşfedilmesinden sonra, çiftleşmeyi sağlayan koşullar tanımlanmaya çalışılmıştır. İlk önemli bulgulardan biri, çiftleşmenin laboratuvarında rutin olarak gerçekleşmesine olanak sağlayan V8 suyu içeren katı besiyerinde verimli bir şekilde gerçekleştiğinin keşfedilmesidir [96]. V8, sebzenin suyundan üretilip ve piyasadan kolaylıkla temin edilebilmektedir. SLAD (süper düşük amonyum dextrose) [50 μ M (NH₄)₂SO₄] ve filament agar (ilave nitrojen kaynağı yok) gibi azot sınırlayıcı ortam da çiftleşmeyi destekler ancak V8 agarı kadar verimli değildir. %2 glikoz, 38 μ M (NH₄)₂SO₄ veya her ikisinin eklenmesi, V8 ortamında çiftleşmeyi engellemez ve bu nedenle, çiftleşmeyi destekleyen bazı aktif bileşikler, V8 ortamında bulunmaktadır. Daha önceki çalışmalar, aktif bileşiklerin suda çözünür, ısıya dayanıklı ve 10 kDa'dan daha düşük bir moleküler ağırlığa sahip olduğunu göstermiştir [37].

V8 suyuna ek olarak, havuç ve domates suyu da çiftleşmeyi desteklemektedir. Ayrıca, birkaç *Cryptococcus* türü ağaçlardan ve fermente meyvelerden izole edilebilmekte, bu da *C. neoformans* ve *C. gattii*'nin doğasının cinsel üremesine katkıda bulunabilecek potansiyel bitki-mantar etkileşimlerinin olabileceğini düşündürmektedir. Bu hipotezi keşfetmek için, *Arabidopsis thaliana* ve *Okaliptüs camaldulensis* fideleri, potansiyel mantar-bitki etkileşimlerini incelemek için model olarak kullanılmıştır. Bu modellerde, Xue ve ark. bitki yüzeyinde çiftleşmenin olabileceği keşfetmişlerdir. Myo-inositol ve bitki hormonu indoleasetik asitin (IAA) çiftleşmeyi uyardığı tespit edilen bitki kaynaklı iki ana bileşiktir [37]. Bitki doku kültüründe yaygın olarak kullanılan Murashige ve Skoog (MS) besiyerinde, kolonilerin kenarlarında bol miktarda basidiospor zincirleri üreten *C. neoformans*'ın sağlam bir şekilde eşleştiği gözlemlenmiştir. V8 birleşme ortamı üzerinde sınırlı miktarda spor ve filament üreten standart serotip A referans suşları H99 ve KN99a için bile, iki suşu MS ortamı üzerinde biriktirmek son derece bol sporülasyona yol açmaktadır. MS, tanımlanmış bir ortamdır ve miyoinositol (100 mg / litre) MS ortamındaki çiftleşmeyi indükleyen bileşik olarak belirlenmiştir. Daha önce yapılan bir çalışmada, V8 suyunun 16.675 mg / litre miyoinositol içerdiği ve bu miyoinositol seviyesini içeren MS ortamının sağlam çiftleşmeyi desteklediği bildirilmiştir. Bu nedenle miyoinositol, V8 suyunda *Cryptococcus*'un çiftleşmesini uyaran bir faktördür [97].

Miyoinositol'e ek olarak, IAA'nın ayrıca düşük konsantrasyonda (<100 mcM) çiftleşmeyi artıran ve in vitro olarak miyoinositol ile sinerjistik olarak etki eden başka bir bitki türevi bileşik olduğu tanımlanmıştır. Bu ilginçtir, çünkü IAA'nın *S. cerevisiae* istilacı büyümeyi indüklediği gösterilmiştir. Bu kanıtların tümü, doğadaki mantar-bitki etkileşimlerinin, *C. neoformans* ve *C. gattii*'nin cinsel döngüsünde önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir [37].

Işık, organizmaların çoğunun algılayabileceği ve yanıt verebileceği kritik bir çevresel ipucudur. Mantarlarda ışık, sirkadiyen ritim, pigmentasyon, cinsel ve aseksüel üreme gibi bazı fizyolojik ve gelişimsel süreçleri düzenlerken, bazı türler bunlara karşı kördür [37]. Işık algılama mekanizmaları, beyaz yakalı proteinlerin (WC-1 ve WC-2) ışık tepkilerini düzenleyen merkezi bir kompleks oluşturduğu *Neurospora crassa* modelinde en iyi şekilde anlaşılmaktadır. Araştırmacılar *C. neoformans*'ın ışık tepkisini, folyo içinde eşleşen plakalarla örtüşme çiftleşmeyi arttırırken, eşleşen plakaları sabit beyaz ışık altında bırakmanın eşleşmeyi engellediğini ortaya çıkarmıştır. Moleküler seviyede, korunan beyaz yakalı genler BWC1 ve BWC2, ışık tepkilerini düzenleyen fotoreseptörleri kodlamak için tanımlanmıştır. İlginç bir şekilde, BWC1 ve BWC2 mutantları zayıflatılmış virülans sergiler, bu da çiftleşmeye ek olarak ışık algılamanın *C. neoformans*'ın virülansı için de kritik olabileceğini düşündürmektedir [98].

Su ve CO₂ de *C. neoformans*'ın çiftleşmesini etkileyen ve her yerde bulunan iki sinyaldir. *C. neoformans*'ın çiftleşmesi katı yüzeylerde meydana gelmekte olup ve sıvı kültürlerde hiç gözlenmemiştir. Standart V8 eşleşme ortamı%4 agar içerir (normal ortam %2 agar içerir) ve eşleştirmenin daha kurutulmuş koşullarda (plaka kapaklarında) daha dayanıklı olduğu gözlenmiştir. Suyun nasıl algılandığı bilinmese de CO₂ çiftleşmede birçok rol oynamaktadır. Yüksek bir CO₂ konsantrasyonunda (%5), çiftleşmenin erken evresi boyunca hücre-hücre füzyonu normal ortam koşulları ile (~%0.036) karşılaştırıldığında <%1'e düşürülmektedir. Bu muhtemelen yüksek CO₂ koşullarında çiftleşme işleminde feromon geninin indüksiyonunun erken inhibe edilmesinin bir sonucudur. İlginç bir şekilde, cinsel gelişim kademesinin aşağı akışındaki bir olay olan basidiospore oluşumu için CO₂'nin gerekli olduğu görülmüştür [99].

C. neoformans genellikle kuş dışkılarından izole edilmekte ve çalışmalar, güvercin guano içeren besiyerinin *C. neoformans* serotip D izolatlarının büyümesini ve cinsel gelişimini desteklediğini göstermiştir [100]. Daha yeni bir çalışmada, Nielsen ve ark. ilginç bir şekilde, hem *C. neoformans* (var. *grubii* ve var. *neoformans*) hem de *C. gattii*'nin güvercin guano ortamı üzerinde yetişmesine rağmen, her iki çiftleşme tipindeki hücrelerin biriktirilmesi durumunda sadece *C. neoformans*'ın sağlam bir şekilde çiftleştiğini bulmuşlardır [101]. Güvercin guano besiyerinde kültürlenen suşlarda standart V8 eşleştirme besiyerinde kültüre kıyasla daha fazla filament, basidia ve basidiospor gözlenmiştir. Aksine, güvercin guano besiyeri, *C. gattii*'nin tipik olarak ağaçlardan izole edildiği ancak kuş dışkısından izole olmadığı gerçeğini desteklememektedir. Bu bulgular, güvercin guano besiyerinin *C. neoformans* için gerçek bir ekolojik niş olduğunu ve *C. gattii*'nin doğada cinsel döngüyü tamamlamak için farklı çevresel sinyallere cevap verebileceğini göstermektedir [101].

Korunan sinyal yollarının mantarlardaki gelişimi ve fizyolojik tepkileri düzenlediği bilinmektedir. *C. neoformans*'ta bu korunmuş yolların birkaçının cinsel üremeyi düzenlediği gösterilmiştir. Bunlar arasında, feromonla ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) sinyal kaskadı ve besin algılayan cAMP yolu, ökaryotlarda en iyi anlaşılan sinyalleme yolları arasındadır [37].

Feromon sinyalleşme yolu, Ascomycota ve Basidiomycota'da korunur. Bu yoldaki en fazla akışkan bileşenin homologları olan feromon reseptörleri, birçok türde tanımlanmış ve karakterize edilmiştir [102, 103]. *C. neoformans*'da, MAT kodlu feromon reseptör genleri STE3a (CPRa) ve STE3 α (CPRa) feromon algılaması ve cinsel gelişim için önemlidirler [100]. Feromon reseptörlerinin ekspresyonu, V8 birleşme ortamı üzerinde çiftleşme sırasında indüklenir ve YPD (maya özü, pepton, dekstroz) ortamı gibi besin açısından zengin koşullar altında zorlukla saptanabilmektedir. Feromon reseptörlerinden yoksun mutantlar ciddi çiftleşme kusurları sergilemektedir ve feromon algılaması için bozulmaktadır. İlginç bir şekilde, STE3a mutantının bir murin virülans modelinde daha az virülan olduğu bildirilmiştir, bu da konağın içindeki virülansın düzenlenmesinde ilave roller oynayabileceğini düşündürmektedir. Feromon reseptörleri, reseptör aktivasyonu üzerine hücreye sinyal ileten heterotrimerik G proteinlerine bağlanır. Üç G protein a alt birimi, Gpa1, Gpa2 ve Gpa3, *C. neoformans* genomunda kodlanmıştır [37].

2.8. Ekolojik Yapı

Genetik olarak izole edilmiş *C. neoformans*, *C. neoformans* var. *grubii* (serotip A) ve *C. neoformans* var. *neoformans* (serotip D), % 95-96 aynı DNA dizi kimliğini paylaşmaktadırlar [104]. Ek olarak, diploid AD hibritleri genellikle çevresel numunelerden ve hasta numunelerinden izole edilmektedir [105, 106].

C. neoformans'ın doğal rezervuarları olarak çok farklı iki habitat dikkat çekmektedir; yabani güvercinlerin (*Columba livia*) dışkıları ve çürümüş odun. Birçok ağaç türünün çürümüş bölgelerinden serotip A, D ve AD hibritlerinin suş izolasyonu yapılmıştır [106].

C. gatti de *C. neoformans* ile benzer ortamlardan izole edilmiştir. Mevcut kanıtlar çürümüş ahşabın *C. gattii* için birincil ekolojik bir niş olduğunu ve coğrafi konumlara bağlı olarak, çeşitli yerli ağaçların bu türü barındırabileceğini göstermektedir. Örneğin, *C. gattii*, Avustralya'daki okaliptüs ağaçlarından, Kolombiya'daki badem ağaçlarından ve güneybatı Kanada'daki köknar ağaçlarından çok uzun süre izole edilmiştir. Buna karşılık, *C. neoformans*, güvercin dışkısı ile iyi bir yakınlığa sahiptir [106, 107]. Çok daha az sıklıkla, diğer kuşların dışkıları ile de ilişkili

habitatlardan izole edilmiştir. *Cryptococcus*'un türleri fermantatik değildir ve subtropik ortamlarda UV ışığı ve 44 ° C'nin üzerindeki sıcaklıklarda tür inhibe edilmektedir [37].

Kuş habitatlarından yapılan izolasyonlardan başlayarak yapılan dışkı analizleri, kurutulmuş güvercin dışkılarının *C. neoformans*'ın büyümesi ve zenginleştirilmesi için mükemmel doğal bir substrat sağladığını belirlenmiştir. Bu ortamda, maya hücreleri yüksek üre, katekolamin ve diğer azotlu bileşik konsantrasyonlarını katabolize edebilmektedir [108]. Ayrıca lakkaz üretmektedirler ve UV radyasyonuna, aşırı sıcaklıklara, oksidatif bileşiklere karşı bir miktar koruma sağlayan kuş gübresiyle melanize olmaktadır. Melanın ayrıca gümüşü ve diğer toksik ağır metalleri şelatlar ve bozunma enzimlerine karşı korumaktadır [109]. Ek olarak, kuş dışkıları rakip veya zararlı mikropları engelleyebilmektedir. Örneğin, bazı *Candida* ve *Pichia* türleri, *C. neoformans*'a karşı aktif olan öldürücü toksinler üretmekte olup pH 4 ila 6'da aktif olan bu öldürücü suşlar, güvercin ve kanarya dışkısından izole edilmiştir. Ancak, *C. neoformans* daha asidik koşulları tercih edebilmektedir [110].

Bu çevresel niş, son derece iyi bir insan kriptokokoz kaynağıdır. Güvercin gübrelerinin *C. neoformans*'ı barındırdığı görülen yerlerde, havanın maya hücrelerinin veya bazidiosporlarının aerosollerini veya her ikisinin bir karışımı tespit edilmiştir. Güvercin gübresinden izole edilen maya hücreleri minimal boyutta kapsüller olma eğilimindedir [111, 112].

2.9. Çevre Ve Konak; Genomik Yaklaşım

HIV ile uzun süredir devam eden mücadele ve 1990'lerde yüksek derecede aktif antiretroviral tedavinin (HAART) gelişmesine rağmen, kriptokokozdan hala her yıl 600.000'den fazla insanın bu hastalıktan öldüğünü tahmin ederek, özellikle gelişmekte olan ülkelerde bir sorun olmaya devam etmektedir [37]. *Cryptococcus* türleriyle enfeksiyon genellikle AIDS'i tanımlayan bir hastalık olarak kabul edilirken, Vancouver Adası'ndaki *C. gattii* salgını, *C. neoformans* türlerinin kompleksinin, konakçı bağışıklık savunmasından kaçınması ve hastalığa neden olma potansiyeli altındadır. 1999'da araştırma topluluğu içindeki bir grup, *C. neoformans*'ın yalnızca tek bir ökaryotik genom dizisinin tamamlandığı bir zamanda dizilebilme olasılığını tartışmıştır [113].

2005 yılında, birbirine yakın iki serotip D suşunun genom dizisinin ilk raporu yayınlanmıştır. 19 Mb'de ve tahmini 6.500 genle, genom fiziksel olarak *Saccharomyces cerevisiae*'nin genomuna yaklaşık %50 daha büyüktür, ancak benzer sayıda gen içermektedir. Sıralama tamamlandıktan sonra üç *C. neoformans* suşu için ek açıklama aşamasında, A H99

serotipi ve BR265 ve WM276 serotipleri açıklanmıştır. Bu nedenle, *C. neoformans* araştırmacıları, evrimsel ayrışma ve patojenik kabiliyette farklılık gösteren izolatları temsil eden beş tam genom sekansına sahip olmalarıyla mikoloji araştırma topluluğu arasında olağandışı bir konumdadır [114].

C. neoformans'ın patogenezi hakkında fikir edinmek için başka bir yaklaşım, virülans faktörü olan lakkazı, virülans için bir taşıyıcı markör kullanarak mutantları taramak olmuştur [115]. LAC1 geni tarafından kodlanan lakkaz, *C. neoformans*'da, bir dizi immünomodülatör molekül üretmek için konakçı hücre katekolaminlerini kullanan iyi bilinen bir virülans faktörüdür. Enzim tarafından üretilen görünür melanin pigmentlerini in vitro olarak kullanır ve böylece lakkaz mutantları katekolamin içeren ortamlarda büyütüldüğünde kolayca beyaz koloniler olarak tanımlanmaktadır. Tüm mutantların ayrıca lakkaz yapısal genin mutantlarından çok daha büyük, azaltılmış virülans göstermesi bakımından şaşırtıcı derecede başarılı olmuştur. Bu, lakkazın kriptokok virülansındaki merkezi rolünün bir göstergesidir, sadece bir oksidoredüktaz olarak enzimatik aktivite açısından değil, aynı zamanda virülans olarak adlandırılan, virülansla ilişkili ekspresyon ağları içindeki merkezi yerleşimi sayesinde [37].

1990'lı yılların başında bir MATa ve MAT α serotip D suşları seti geliştirilmiştir [37]. En yaygın kullanılan soy kümelerinden biri haline gelmişlerdir. Kongenik MATa ve MAT α suşları JEC20 ve JEC21 arasındaki virülanstaki fark, çiftleşme tipi ve virülans arasındaki bağlantıyı araştırmak için alanı etkilemiştir [37]. Bu gözlem ile aynı suşları ters çaprazlanmış ve bağımsız olarak yeniden üretilmiştir. Ancak durum suşa bağlı görünmektedir, çünkü bağımsız bir konjenik serotip D suşu seti için, MATa ve MAT α ebeveynleri arasında virülansta bir fark yoktur [116].

Dünya çapında, A serotipi, *C. neoformans*'ın klinik formu olduğu kadar çevresel formu olarak da baskındır. Bu serotip için genetik bir sistem, bir çiftleşme tipinin bir türünün tanımlandığı 2000 yılına kadar zor gibi görünmüştür [117]. Bununla birlikte, bugün bile, Botswana'da küçük bir nüfus ve Avrupa'da sporadik izolasyon dışında Amerika Birleşik Devletleri dahil birçok alanda MATa türü bulunmamaktadır [118, 119]. Bu çiftleşme tipinde kongenik çiftlerin gelişimi, serotip A suşlarını kullanarak genetik çalışmalarını kolaylaştırmıştır [37]. Bununla birlikte, birçok serotip A suşunun çiftleşme etkinliği serotip D suşlarına göre daha düşüktür ve hızlı genetik analiz yapmak veya *C. neoformans*'ta cinsel süreci incelemek isteyen araştırmacılar için serotip D birçok avantaj sunmaktadır.

2.10. Çevresel Niş

Kriptokokoz vakalarına sırasıyla 100 ve 40 yıl önce keşfedilen iki kardeş tür olan *Cryptococcus neoformans* veya *Cryptococcus gattii* neden olmaktadır [127]. *Cryptococcus* türleri çevrede bulunmaktadır ve büyümeleri sırasında, maya hücreleri bazidiosporlar ile hava yoluyla bulaşabilmekte, insanlar veya diğer omurgalılar tarafından solunabilmekte, konakçıda doğal ve immün tepkiler ortaya çıkaran bir pulmoner enfeksiyon oluşturabilmektedirler. Bu işlem sırasında, maya hücrelerinin latent veya uyku halinde olması gelecekte reaktivasyon potansiyeli ile sekense edilmesine veya merkezi sinir sistemine yayılma eğilimi olan aktif hastalıklara yol açabilmektedir. Bu sonuçlardan bir veya daha fazlası ortaya çıkabilmekte olup bunlar birbirinden ayrı değildir sırayla veya aynı anda oluşabilmektedirler [128].

Kriptokokal hastalıkta ilerleme, tek veya multiorgan tutulumu ile subakut veya kronik olabilmektedir. Bu olayların manifold varyasyonları tarif edilmiştir ve kümülatif kanıtlar hemen hemen her sistemik kriptokokal enfeksiyonun bireysel konakçı ile sona erdiğini göstermektedir [129]. Omurgalı konakçıların spektrumu geniştir. Çoğu kriptokokoz vakası, immün yetmezliği olan kişilerde görülmektedir [130]. *C. neoformans* ve *C. gattii*'ye ek olarak, *C. albidus*, *C. laurentii*, *C. adeliensis*, *C. humicolus*, *C. uniguttulatus* ve *C. luteolus* dahil olmak üzere başka birçok *Cryptococcus* türüyle nadir enfeksiyonlar bildirilmiştir [37].

Patojenik *Cryptococcus*'un çevresel izolasyonu, Friedrich Staib'in *C. neoformans*'ın, niger tohumları ile desteklenmiş besiyerinde (*Guizotia abyssinica*) yetiştirilmesiyle, hücre duvarlarında melanin oluşumuna neden olmuştur ve bu fenotipin, kahverengi ile siyah renkte koloniler ürettiğini keşfetmiştir [131]. Bu pigmentin oluşumu, uzun melanin polimerleri üretmek için çeşitli difenolik substratları oksitleyen lakkaz ile katalize edilmektedir. Uygun bir substratta birkaç günlük bir büyümenin ardından koloniler, kolayca tanınabilen bir renk ve zaman zaman mukoit bir görünüm kazanmaktadırlar. Staib'in agar besiyeri, klinik laboratuvarlarda *C. neoformans* ve *C. gattii* tanımlarını onaylamak için, özellikle steril olmayan numunelerde (örneğin, cilt, idrar) pozitif olarak reaksiyona giren patojenik mantarlar olarak kullanılmaktadırlar [132].

Pigment oluşumu yani melanin lakkaz enzimi ile oluşturulmakta olup bu *Cryptococcus* türleri için önemli bir virülans faktörüdür ve substratları katekolaminler içermektedir. Hücre duvarlarının melanizasyonu mayaları konak savunmasından korumaktadır [133, 134]. Hücrelerin, güvercin dışkısında büyümesi gibi doğal koşullar altında melanin ürettiği gösterilmiştir ve melanin, hücreleri, metalik iyonlar, bozunma enzimleri, yüksek sıcaklıklar, UV

ışığı gibi olumsuz çevresel koşullardan korumaktadır [135]. Melanize kriptokok mayaları, amipler ve balçık kalıpları gibi fagositik çevresel yırtıcılarla öldürülmeye karşı daha dirençlidir. Melaninin ve kapsülün birleşik antifagositik özellikleri, memelilere bulaşabilme yeteneğini açıklayabilmektedir [136].

Çevresel örnekler toplandıktan sonra, *Cryptococcus*'un en iyi şekilde geri kazanılması için mümkün olan en kısa sürede işleme alınmaları gerekmektedir. Staib'in besiyerinin mevcut formülasyonları, niger çekirdeği ekstraktı, glikoz, agar, antibakteriyeller (örneğin, kloramfenikol ve gentamisin) ve bifenil ile tamamlanmaktadır [137, 138]. Katı ve yarı-katı numuneler steril su veya tuzlu su içinde kuvvetlice karıştırılıp, partiküllerin çökmesine izin verilip, berraklaştırılmış üst kısım seyreltilip, Staib'in agarı üzerine ekimi yapılmaktadır. 30 °C'de inkübasyona bırakılıp günlük olarak kahverengi görünüm için kontrol edilmektedir. Potansiyel kriptokokal koloniler pasajlanıp tanımlanmaktadır.

David H. Ellis, *C. gattii*'yi *Okalipüt camaldulensis*'ten izole eden ilk kişidir. Bu bilimsel keşif, ağaç rezervuarlardaki *Cryptococcus*'un küresel arayışını ateşlemiştir ve sonunda *C. neoformans* ve *C. gattii*'nin birçok ağaç türünde yaşayabileceğinin farkına varılmıştır [37]. *C. gattii*'yi herhangi bir çevresel numunedan izole etme prosedürü *C. neoformans* için tarif edilenle aynıdır. Bununla birlikte, *C. gattii*'nin kritik tanımlanması, sadece *C. gattii*'nin ortama mavi bir renk verdiği diferansiyel besiyeri olan canavanin-glisin-bromotimol mavisini agarının geliştirilmesiyle sağlanmıştır [132].

C. neoformans ve *C. gattii*'nin tanımlanmasının ötesinde, bu türlerin genetik karakterizasyonu ve enfeksiyon kaynağının yanı sıra kriptokokozun klinik belirtileri, yönetimi ve prognozu ile ilgili tüm sonuçları ayırt etmek gerekmektedir. *Cryptococcus* türleri ökaryot olduklarından, büyük genlere sahiptirler ve virülans belirleyicileri poligenik ve karmaşıktır. Örneğin, *C. neoformans* ≈20.2 Mb genom boyutuna, 14 kromozoma ve tahmini 6.500 gene sahiptir [139].

2000'li yılların gelişile yeni verilerin hızlı bir şekilde elde edilmesi, *Cryptococcus*'un klinik ve çevresel izolatlarının önemli ölçüde fenotipik ve genetik çeşitlilik gösterdiğini doğrulamıştır. Bu çeşitlilik, tarihsel ve/veya mevcut evrimsel süreçlerin yanı sıra gen değişimi ve kromozomal düzenlemeler için çoklu mekanizmaları yansıtabilmektedir. Örneğin, *Cryptococcus*'un göze çarpan, karşılaştırmalı genomiklerle ABD Pasifik Kuzeybatı'sında devam eden benzersiz suşların patlak vermesiyle, genetik bilgi alışverişinde bulunacak yeni mekanizmaların keşfedilmesiyle gösterilmiştir [140].

Yeni klinik veya çevresel izolatlar, anahtar fenotiplerle *C. neoformans* veya *C. gattii* olarak hızlı bir şekilde tanımlanabilmektedir. Kapsüllenip, tomurcuklanan mayalar ve diğer *Cryptococcus* türleri benzer şekilde üreaz üretirler, ancak sadece patojenler 37 °C'de büyür ve Staib'in niger besiyerinde kahverengi koloniler geliştirmektedirler [141].

2.10.1 *C. neoformans*

C. neoformans'ın AIDS ile ilişkili enfeksiyonlarının büyük çoğunluğu, kolaylıkla ortamdaki izole edilebilen kozmopolit VNI suşları popülasyonundan kaynaklanmakta ve VNII suşları da her kıtadaki insanlarda enfeksiyona neden olup çok az izolasyonu olmuştur [138]. Bugüne kadar VNB suşları olan tüm klinik vakalar Sahra altı Afrika'da veya Brezilya'da meydana gelmiştir. VNIV (serotip D) ve VNIII (AD hibritleri) suşları dünya genelinde çevre ve hastalardan izole edilmiştir. Bununla birlikte, VNIII ve VNIV ile enfeksiyonlar, Avrupa'da önemli ölçüde az görülmektedir [138, 142]. HIV / AIDS ve bağışıklık sistemini baskılayan, güçlü nedenler olmasına rağmen, immün yetmezlikte *C. neoformans* enfeksiyonlarının da sayısız raporu vardır. Bu görünüş olarak "normal" konaklarda, akciğer enfeksiyonları daha sık görülüp yayılma da meydana gelmektedir [141, 143].

2.10.1.2. *C. neoformans*'ın Çevresel Kaynakları

Hastalarda olduğu gibi, her iki *C. neoformans* çeşidi, *C. neoformans* var. *grubii* ve *C. neoformans* var. *neoformans*, çevreye küresel olarak dağılmıştır, ancak A serotipi her yerde bulunmakta ve serotip D Avrupa'da daha yaygın görülmüştür. Serotip A suşları, çoğu kriptokokoz vakası ve AIDS'li hastalarda vakaların %95'inden sorumludur [129]. *C. neoformans* her yerde bulunan bir tür olmasına rağmen, Kuzey Rusya, Kanada ve İskandinavya gibi bölgelerde tropikal ve ılıman bölgelere göre daha az yaygındır [144, 145].

2.10.1.3. Ağaçlar

C. neoformans son yıllarda, Arjantin, Kolombiya, Brezilya, Hindistan, Güney Afrika, Tayland dahil olmak üzere dünyanın çeşitli yerlerinde, çeşitli ağaçlardan artan sayıda bildirilmiştir. Bu nedenle, *C. neoformans*, kuşların yanısıra ağaçlarda da bulunmaktadır [146-155].

2.10.2. *C. gattii*

C. neoformans'ın aksine, küresel epidemiyolojik çalışmalar, *C. gattii* ile enfeksiyonların çoğunun immünokompetan kişilerde meydana geldiğini sürekli olarak göstermiştir. Önemli sayıda klinik izolatin genotiplendiği coğrafi bölgelerde, her bir alt grubun nispi prevalansı değişme eğiliminde olup gözlemlenen modellerin şu andaki VGII enfeksiyonu salgını olduğu gibi kararlı mı yoksa gelişmekte mi olduğunu belirlemek için daha fazla veri gerekmektedir [156]. Güney Amerika'da dört alt grubun tümü rapor edilmiştir, ancak daha fazla vaka VGII ve VGIII ile ilişkilendirilebilmektedir [157]. Afrika'da HIV / AIDS prevalansı en yüksektir, ancak *C. gattii* insidansı düşüktür ve bildirilen enfeksiyonların çoğu VGIV kaynaklı olup, AIDS hastalarında meydana gelmiştir [158-160]. Avrupa ve Asya'da görülme sıklığı da nispeten düşüktür ve genellikle VGI veya VGII'ye bağlıdır [161, 162]. Avustralya'daki çoğu klinik vakaya VGI neden olmaktadır, bunu takiben VGII sıklığı görülmektedir, ancak bölgesel farklılıklar not edilmiştir [163-165]. Avustralya'daki çok sayıda vaka incelemesi, VGII'nin Batı Avustralya'da baskın olduğunu, ancak *C. gattii*'nin daha az yaygın olduğunu ve genellikle doğu kıyılarındaki VGI'dan kaynaklandığını tespit etmiştir [166].

2.10.2.1. *C. gattii*'nin Çevresel Kaynakları

C. gattii, *C. neoformans*'tan coğrafi dağılım, serotipler, ekoloji, klinik belirtiler, immünokompetan konakçılarda görülme sıklığı, birkaç in vitro fenotip ve risk altındaki hastalarda görülme sıklığından farklıdır. *C. gattii*'nin prevalansı hastalarda ve çevrede daha sınırlıdır. Çevrede, *C. gattii* uzun zamandır ağaçlar, ağaç oyukları ve çürümüş odunlarla ilişkilendirilmiştir ve bu türler *E. camaldulensis* ve diğer Okaliptüs çeşitlerinin yanı sıra Avustralya'daki ve diğer yerlerdeki diğer ağaç türlerinden izole edilmiştir [167, 168]. Her ne kadar Okaliptüs ağaçları diğer ağaçlardan daha fazla örneklenmiş olsalar da *C. gattii*'nin kurulduğu yerde yerli ve yerleştirilmiş ağaçları doldurduğu ve *C. gattii*'yi barındıran ağaç türlerinin Arjantin, Avustralya, Brezilya, Kanada, Kolombiya'da farklı olduğu açıkça görülmüştür.

2.11. Kriptokokal Hastalıkta Halk Sağlığının Önemi: Epidemiyoloji, Yük ve Kontrol

Son 30 yılda kriptokokoz epidemiyolojisi çarpıcı biçimde değişmiştir. Önceleri immünokompetan konakçılarda nadir görülen bir enfeksiyon olarak görülüyordu fakat kriptokokoz insidansı AIDS salgını ile birlikte dünya çapında patlamıştır. Bununla birlikte, son on yılda, antiretroviral (ARV) ilaçlara yaygın erişimi olan ülkeler, kriptokokoz insidansı ve yükünde önemli bir azalma görmüştür. Bu, kaynak sınırlı ortamlarda, özellikle ARV'lere erişimin hala çok

sınırlı olduğu Sahra altı Afrika'da geçerli değildir. Bu ülkeler, birçok ölümle birlikte yüksek oranda kriptokokoz insidansı yaşamaya devam etmektedir ve bazı bölgelerde hastalık tüberkülozdan daha sık ölüm nedeni olarak görülmektedir.

Günümüzde kriptokokoz, özellikle az gelişmiş ülkelerde HIV / AIDS ile yaşayan insanlar arasında en önemli fırsatçı enfeksiyonlardan biri olmaya devam etmektedir. Kriptokokoz epidemiyolojisindeki bir diğer önemli değişiklik, Kuzey Amerika'da *Cryptococcus gattii*'nin primer patojen olarak ortaya çıkmasıydı.

Cryptococcus'un neden olduğu hastalıkların büyük çoğunluğu HIV ile enfekte olmuş kişilerde bulunmaktadır. HIV ile ilişkili kriptokokozun epidemiyolojisi, dünyanın farklı bölgelerinde yaşayan en yüksek sayıda insanın olduğu bölgelerde meydana gelen en yüksek vaka sayısı ile büyük ölçüde değişmektedir. Bazı bölgelerde kriptokokal menenjit insidansını önemli ölçüde azaltan halk sağlığı başarılarına rağmen, bu hastalığa bağlı insidans ve mortalite kaynak sınırlı ortamlarda önemli kalmaktadır.

Dünyada HIV'in en büyük yükü 25.000.000'den fazla kişiyle Sahra altı Afrika'da görülmektedir. Bu bölgedeki kriptokokoz epidemiyolojisini değerlendirmek için çok az çalışma yapılmış olmasına rağmen, hepsi genel olarak çok yüksek bir yük göstermiştir. Rapor edilen insidans, AIDS'li kişilerle, serum kriptokokal antijen (CrAg) testi kullanılarak rutin olarak taranan kişilerde %47 ile %12.2 arasında değişmiştir [169, 170].

Güney ve Güneydoğu Asya'da, Hindistan'daki büyük ve gelişen bir HIV salgınının katkısıyla, en büyük ikinci kriptokokal hastalık yüküne sahiptir. Yalnızca Hindistan, HIV ile yaşayan yaklaşık 3.1 milyon ila 9.4 milyon kişiye ev sahipliği yapmaktadır [171]. Hindistan'dan gelen raporlar, HIV / AIDS'li kişiler arasında kriptokoklar için yüksek insidans oranlarını belgelemiştir. İnsidans, kuzey Hindistan'da %1.7 ile güneyde % 4.7 arasında değişmektedir [172, 173]. HIV'li bir grup hastanede yatan kişiden yaklaşık % 2'sinde kriptokokal menenjit vardı; bu kişilerin üçte biri aynı zamanda tüberküloz ile koinfekte edilmiştir [174]. Tüberküloz ile koinfeksiyon ciddi bir problem olabilir, çünkü çoğu zaman, tüberküloz teşhisi konduktan sonra, diğer eşzamanlı enfeksiyonları teşhis etmek için başka bir çaba gösterilmez. Bu nedenle hastalar daha fazla tanı çalışması olmadan uzun süre hayatına devam edebilir ve ölüme kadar hiçbir şekilde teşhis edilemez.

Tayland'da, AIDS'li 100.000'den fazla kişiden yapılan bir anket, enfekte olmuş kişilerin yaklaşık %20'sinde kriptokokal menenjit olduğunu göstermiştir [175]. Çalışmalar aynı zamanda

hastanede yatanlar arasında % 36 prevalansı tanımlamış ve Kriptokokoz'u en yaygın fırsatçı enfeksiyon olarak bildirmiştir [176, 177].

Kuzey Amerika'da en son kriptokokal menenjit insidansı tahminleri düşüktür. 1992 ve 2000 yılları arasında Atlanta ve Houston'dan yapılan nüfus temelli sürveyans, 1992'de 100.000 nüfus başına ortalama 4-5 vaka görülmüştür [178].

Avrupa'da yapılan araştırmalar, büyük ölçüde ARV'lerin ortaya çıkmasıyla çakışan kriptokokoz ve diğer fırsatçı enfeksiyonların yükünde kayda değer bir düşüş göstermiştir. İspanya'da, 1989'dan 1997'ye kadar yapılan 8 yıllık bir çalışma, büyük ölçüde ARV döneminden önce, AIDS'li kişilerde yıllık % 0.2 ila 0.7'lik düşük bir oran bulmuştur [179].

Doğu Asya'dan çok az veri var. Japonya ve Çin'deki epidemiyoloji büyük ölçüde bilinmemektedir [180, 181]. Avustralya ve Yeni Zelanda'yı kapsayan Okyanusya'da yapılan çalışmalar düşük bir kriptokokoz insidansı göstermiştir. Bir ulusal sürveyans projesinde Avustralya'da % 1,4 ila 3,9 ve Yeni Zelanda'da % 3,8 ila 4,9 arasında değişmektedir [182]. Kriptokokozis dahil, fırsatçı enfeksiyonlardaki düşüşler, muhtemelen ARV'lerin ortaya çıkmasına karşılık gelen, 1996'da başlayarak tanımlanmıştır [183].

Bu oranları kullanarak kriptokokal menenjit nedeniyle her yıl dünya genelinde toplam 625.000 ölüm olduğunu tahmin edilmiştir [184]. Yine en fazla ölüm alan bölge, yılda 500.000'den fazla ölümle birlikte Sahra altı Afrika olmuştur. En az ölümün Batı ve Orta Avrupa ve Okyanusya'da yılda <50 olarak gerçekleştiği tahmin edilmiştir [184].

2.12. Klinik Yaklaşım

Dünyada meydana gelen *C. neoformans* kaynaklı kriptokokozislerin aksine, *C. gattii* enfeksiyonunun başlangıçta kuzey Avustralya, Papua Yeni Gine, Orta Afrika ve Malezya gibi subtropikal veya tropikal bölgelerle sınırlı kaldığı ve daha sonra Avustralya'nın ılıman iklim bölgelerini içerdiği düşünülmektedir.

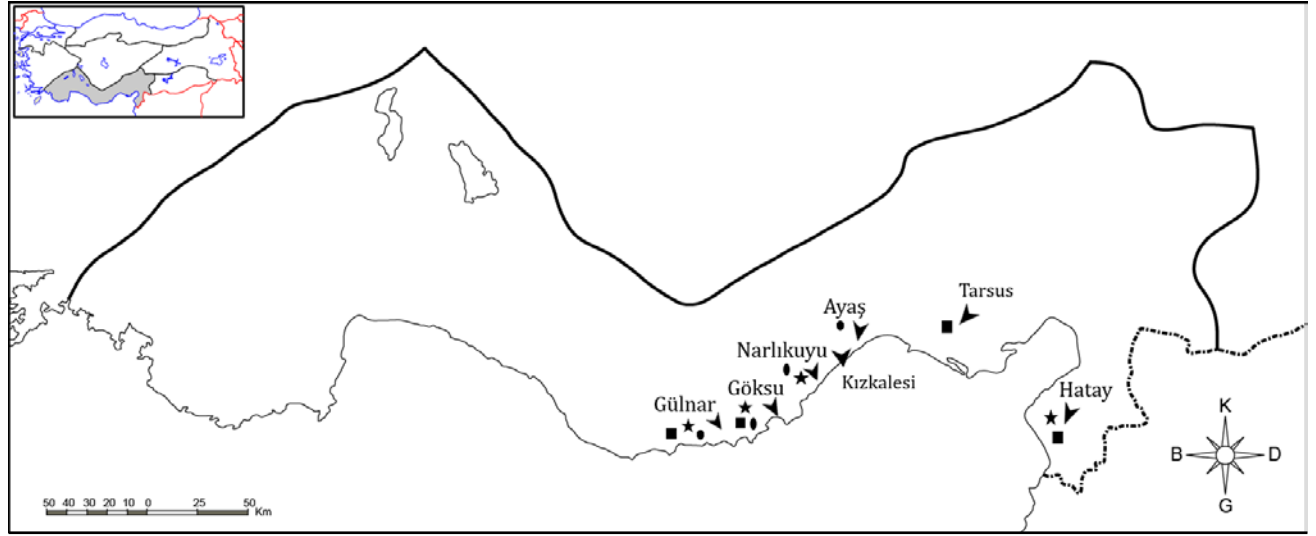
Güney Kaliforniya ve Güney Amerika, Güney Avrupa ve Güney Doğu Asya'daki diğer bazı ülkelerde ara sıra vakalar bildirilmiştir [185-193]. Bununla birlikte, 1999'da Kanada'daki Vancouver Adası'nda ve ABD'nin Kuzeybatı Pasifik bölgesine yayılmış olan *C. gattii* enfeksiyonunun ortaya çıkması, bu türün yeni ve farklı ortamlardan yararlanma yeteneğinin altını çizmektedir [194-197].

İnsan kriptokokozunun klinik sunumunda türlere bağlı farklılıklar iyi tanımlanmıştır ve büyük ölçüdedir, ancak bu yalnızca konakçı immünolojik durumundaki farklılıklar nedeniyle değildir [185, 198]. *C. neoformans*'ın immün yetmezliği olan konakçıların fırsatçı bir patojeni olduğu ve *C. gattii*'nin immün yetmezliği olan hastaların birincil patojeni olduğu genel olarak doğru olsa da *C. neoformans* belirgin sayıda sağlıklı konakçıda hastalığa neden olur ve *C. gattii*'nin neden olduğu kriptokokal meningoensefalit, AIDS, organ transplantasyonu veya diğer immün yetmezlik nedenleri ile immün baskılanmış hastalarda ortaya çıkmaktadır [185, 198-203].

Yakın zamanlarda, güney Kaliforniya'daki AIDS hastalarından suşların retrospektif bir analizinden sonra görece yüksek bir *C. gattii* prevalansının (%12.3) ve Vancouver Adası salgını sırasında *C. gattii* enfeksiyonu olan hastalardan daha muhtemel olduğu belirtilmiştir [204]. Organ transplantasyonu, HIV negatif hastalarda yayılmış enfeksiyon vakalarının %10 ila 20'sini oluşturan kriptokokozis için önemli bir risk faktörü olmaya devam etmektedir. Renal transplantlar kısmen bu grupta görece olarak yüksek oranda kortikosteroid kullanımı nedeniyle meydana gelmiştir [205]. Kriptokokoz genellikle malignite konusunda nadir görülürken, lenfoma ve kronik lösemili hastalar özellikle risk altındadır. Eski serilerde olduğu gibi, hematolojik maligniteler, özellikle lenfoma, en yüksek risk ile ilişkilendirilmiştir. Meme ve akciğer kanseri de kriptokokozis ile ilişkilendirilmiştir [185, 205].

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Çalışma 2019 Nisan ve Mayıs aylarında Mersin-Hatay illeri arasında bulunan arazinin Mersin Gülnar'dan Hatay merkeze kadar olan kısmı zeytin ağacı, keçiboynuzu ağacı ve ökaliptus ağacı *Cryptococcus* cinsi maya mantarının varlığı yönünden taranmıştır (Şekil 4). Bu süre sonunda 303 adet zeytin, 236 adet ökaliptus ve 211 adet keçiboynuzu ağacı olmak üzere toplam 750 ağaçtan Randhawa ve arkadaşları tarafından tanımlanan eküvyon yöntemi ile örnekleme yapılmıştır (Tablo 1). Örnekler yaşlı ağaç üzerindeki derin kovuklardan toplanmıştır (Şekil 5).



Şekil 4. Crptococcus yönünden taranmış olan alanlar; (▲); örnek alınan bölge, (★)zeytin Ağacı, (●) keçiboynuzu Ağacı, (■); ökaliptus ağacı

Tablo 1. Çalışma Süresince Elde Edilen İzolatlar Ait Bilgiler

Ağaç Türü	BÖLGE						
	Gülnar	Göksu	Narlıkuyu	Ayaş	Kızkalesi	Tarsus	Hatay
Zeytin (n=303)	86	60	7	-	-	-	150
Keçiboynuzu (n=211)	128	25	16	19	23	-	-
Ökaliptus (n=236)	11	50	-	-	-	125	50



Şekil 5. Zeytin Ağacı Üzerindeki Kovuklar(Orijinal)

İçerisinde taşıma ortamı (steril edilmiş %0.9 NaCl) bulunan steril eküvyonlar örnek alımında kullanıldı. Taşıma ortamı ile ıslatılan eküvyon, ağaç kovuğunun ve/veya derin yarıklarının farklı bölgelerine sürüldü ve örnekler steril tüp içine aktarıldı (Şekil 6).



Şekil 6. Ağaç Kovuklarından örnek alımı (Orijinal)

Alınan örnekler aynı gün içinde laboratuvara ulaştırıldı. Eküvyonu çıkarılan örnekleme tüpü, bir dakika süreyle vortekslendi ve çökme işlemi için oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Sıvı yüzeyinden 100 µl alınarak %0.1 bifenil ve %0.5 kloramfenikol içeren Staib agara ekildi. Nemli ortamda, 28°C'de 15 gün süreyle inkübasyona devam edildi ve güneşirü üreme kontrolü yapıldı. Staib agarda; kahverengi pigment oluşturan kolonilerin üreaz aktivitesi, 37°C'de üreyebilme ve Dalmau agarda yapısal özellikleri incelendi. Üreaz pozitif, 37°C'de üreyebilen ve hif oluşturmayan kolonilerin Kanavanin-Glisin-Bromtimol agar besiyerinde üremesi gözlemlendi. Ayrıca, *C.neoformans* kabul edilen koloniler moleküler amplifikasyon yöntemleri ile de ileri tanımla testleri yapıldı. Çalışmada kontrol olarak *C.neoformans* KN99 Aa ve *C.neoformans* KN99 Aα, *C.neoformans* JEC 20, JEC 21, LA 55 ve R265 standart suşları kullanıldı.

3.1. Moleküler Yöntemler

Kökenlerin moleküler testlerle doğrulanması için kökenler tekrar Sabouraud Dekstroz agar'a pasajlandı ve taze kültürden örneklerin DNA ekstraksiyonu yapıldı.

3.1.1. Örneklerden DNA Ekstraksiyonu

Saboraud dekstroz agarda ekimi yapılan ve etüvde 37°C'de 24 saatlik inkübasyon periyodunun ardından *C. neoformans* kolonilerinden bir öze dolusu alınan maya örnekleri ependorf tüpe kondu. Üzerine 400µl TEN buffer, 10µl litikaz (7mg/ml), 10 µl proteinaz K (20mg/ml) konur, 10-15 saniye vorteks ile karıştırıldı ve 100µl %10'luk SDS konulup, yine vorteksle karıştırıldı. Ardından 55°C' de 60 dakika inkübe edildi. İnkübasyon tamamlandıktan sonra üzerine 600 µl Fenol, Kloroform, İzamil alkol (25:24:1) ilave edildi ve vorteks ile karıştırıldı. Daha sonra 12000 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden çıkarılan ependorf tüplerinde çökeltinin üzerinde kalan supernatant üst faz (fenol fazı) ayrı bir ependorf tüpe aktarıldı (~ 300 µl) ve üzerine 600 µl -20°C' de muhafaza edilen izopropil alkol ilave edilip vorteks ile karıştırıldı ve 12000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işlemi tamamlandıktan sonra çökelti üzerinde kalan faz dökülerek, üzerine 600µl -20°C' de %70' lik etil alkol eklendi ve vorteks ile karıştırıldı. Ardından 12000 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi. İşlem tamamlandıktan sonra çökelti üst fazı döküldü ve örnekler ortamdaki hava akımında kurumaya bırakıldı. Kuruyan örnekler 80 µl distile su ile süspanse edilirdi ve örnekler PCR aşamasına kadar -20 C de muhafaza edildi.

3.1.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

ITS 1-4 primerleri kullanılarak PCR amplifikasyonu, toplam hacim 25 µl olacak şekilde [12.5 µl 2X karışım (Ampliçon Taq DNA Polymerase Master Mix, Odense, Danimarka); 0.5 µl her bir primerden (100 pmol/µl), 10.5 µl distile su ve 1 µl kalıp DNA] gerçekleştirildi (Tablo 2). Isı döngü cihazı (Techne Prime, Birleşik Krallık)'nda, PCR amplifikasyonu 95°C'te 5 dakika ilk denatürasyonu takiben, 35 döngü 95°C'te 45 saniye denatürasyon, 57°C'te 60 saniye primer birleşmesi, 72°C'te 60 saniye çoğaltma ve 72°C'de 5 dakika son uzama olarak optimize edildi. PCR amplifikasyonu sonrasında elektroforez ile %1.2'lik agaroz jelde 120 voltta 60dakika yürütülen örnekler jel görüntüleme cihazında incelendi.

Tablo 2. ITS1-4 PCR Koşulları

PZR Reaksiyon Karışımı	Miktar (µl)
Taq DNA polimeraz (5 U/µl)	12,5
ITS_1 Forward (100 pmol/ul)	0,5
ITS_4 Reverse (100 pmol/ul)	0,5
Distile su	10,5
<i>Cryptococcus</i> DNA'sı	1
Toplam Hacim	25

3.1.3. Eşey Gen Bölgesi için PCR

Eşey gen bölgesine ait primerler kullanılarak yapılan PCR Reaksiyon karışımı tablo 4'te belirtilmiştir. MAT Da PCR Koşulları tablo 5'te, MAT Aa, MAT Aα, MAT Dα PCR Koşulları tablo 5.1'de gösterilmiştir. *Cryptococcus* genomunda yer alan var. *grubii* için MATa ve MATα primerlerinin 457 bp ve 330 bp' lik DNA bölgesi, var. *neoformans* için MATa ve MATα primerlerinin 728 bp ve 592 bp' lik DNA bölgesi PCR tekniği ile çoğaltıldı. Hedef bölge ile ilgili primer dizileri (Tablo 3) de verilmiştir.

Tablo 3. Araştırmada Kullanılan *Cryptococcus neoformans* Primerleri

	Primer adı	Nükleotid dizileri (5'-3')	Size (bp)
ITS	ITS_1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	
	ITS_4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>	STE20_Aa_Forward	CTA ACT CTA CTA CAC CTC ACG GCA	457
	STE20_Aa_Reverse	CGC ACT GCA AAA TAG ATA AGT CTG	
	STE20_A α _Forward	GGC TGC AAT CAC AGC ACC TTA C	330
	STE20_A α _Reverse	CTT CAT GAC ATC ACT CCC CTA T	
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	STE20_Da_Forward	CAC ATC TCA GAT GCC ATT TTA CCA	728
	STE20_Da_Reverse	AGC TCT AAG TCA TAT GGG TTA TAT	
	STE20_D α _Forward	CTT AAT TCA CAG CAC CAG CCT A	592
	STE20_D α _Reverse	GGT CAT CAC AGT CAG TCA CCA C	

Hedef gen bölge amplifikasyonu PCR ile yapıldı. Bu PCR reaksiyonları için steril distile su, Taq DNA polimeraz, primerler ve ekstrakte edilen DNA karıştırılarak son hacim 25 μ l olacak şekilde hazırlandı. Her örnek için PCR reaksiyon karışımları ve PCR için ısı döngü cihazı sıcaklık koşulları (Tablo 4) ve (Tablo 5) ve (Tablo 5.1) de gösterilmiştir.

Tablo 4. Her Eşey Gen Bölgesine Ait PCR Reaksiyon Karışımları

PZR Reaksiyon Karışımı	Miktar (μ l)
Taq DNA polimeraz (5 U/ μ l)	12,5
Eşey gen bölgesine ait a Forward (100 pmol/ μ l)	0,5
Eşey gen bölgesine ait a Reverse (100 pmol/ μ l)	0,5
Distile Su	9,5
DNA	1
Toplam Hacim	25

Tablo 5. MAT Da PCR Koşulları

Reaksiyon Aşaması (MAT Da)	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	95	6 dakika	} 35
Denatürasyon	95	45 saniye	
Primer Bağlanması (Annealing)	50	45 saniye	
Zincir Uzaması (Extension)	72	1,5 dakika	
Son Uzama (Final Extension)	72	7 dakika	
Bekleme	4	∞	1

Tablo 5.1. MAT A α , MAT A α , MAT D α PCR Koşulları

Reaksiyon Aşaması (MAT A α , MAT A α , MAT D α)	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	95	6 dakika	1
Denatürasyon	95	45 saniye	} 35
Primer Bağlanması (Annealing)	60	45 saniye	
Zincir Uzaması (Extension)	72	1,5 dakika	
Son Uzama (Final Extension)	72	7 dakika	
Bekleme	4	∞	1

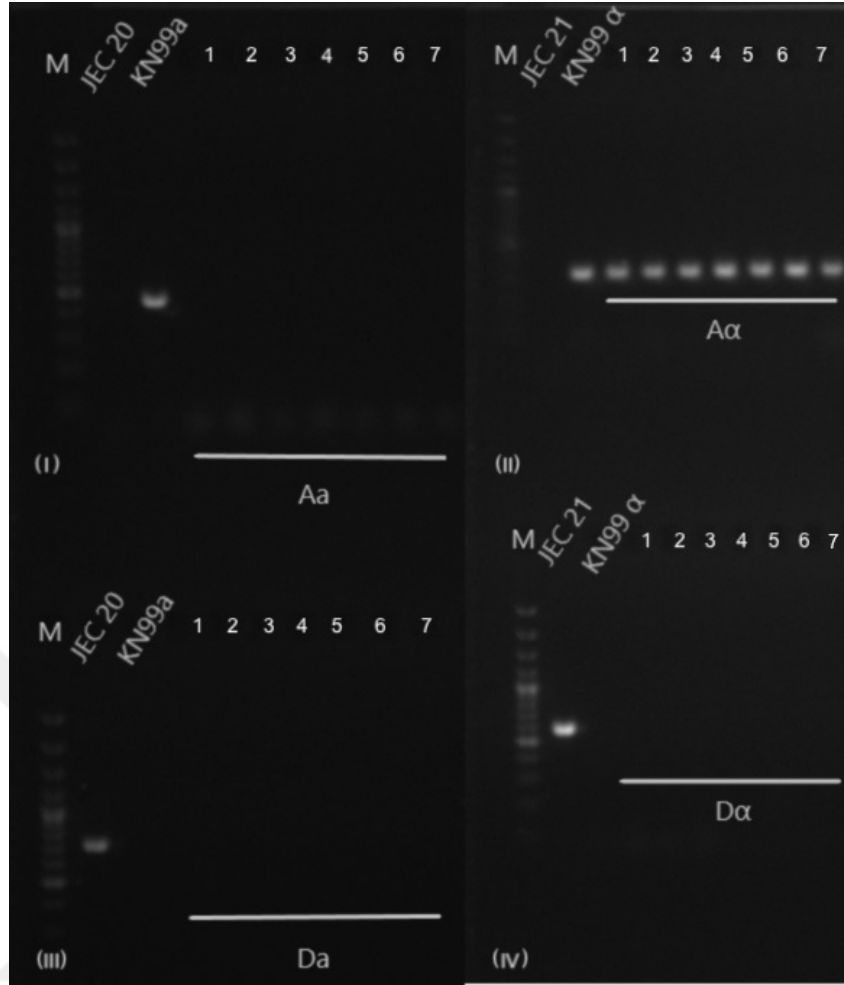
4. BULGULAR

Çalışma 2019 Nisan-Mayıs ayları arasında Gülnar, Mersin-Hatay illeri arasında bulunan zeytin ağacı, keçiboynuzu ağacı ve ökaliptus ağaçlarında *Cryptococcus* cinsi maya mantarının varlığı yönünden araştırılması için 236 ökaliptus, 303 zeytin, 211 keçiboynuzu ağacından alınan toplam 750 ağaçtan toplanan örneklerin 97 tanesinde üreme görülmüştür. Bu verilere göre toplanan örneklerin %12,9'unda üreme gözlenmiştir. Üremenin %3,5'i zeytin ağaçlarında görülmüş olup, %9,4'ü keçiboynuzu ağaçlarında görülmüştür. Üremenin görüldüğü örnekleme yapılan bölgelere ait bilgiler verilmiştir (Tablo 6).

Tablo 6. Üreme Görülen İzolatlar ve Yer Bilgileri

Ağaç Türü	ÜREME (n=97) (%12,9)				
	Gülnar	Göksu	Narlıkuyu	Ayaş	Hatay
Zeytin (n=27) %3,5	15	5	5	-	2
Keçiboynuzu (n=70) %9,4	47	5	13	5	-

Üreme görülen 97 izolatın hepsinde de CGB (Kanavanin-Glisin- Bromtimol agar) besiyerinde üreme gözlemlendi. 97 örnekten yapılan PCR'da ise tüm örneklerin MAT A α serotipinde yani *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* olduğu bulunmuştur (Şekil 7) ve (Tablo 7).



Şekil 7. Eşey gen bölgesine ait PCR jel görüntüsü (Orijinal); (I): M: Marker, JEC20, KN99a ve Aa *Cryptococcus kökeni* (1-7), (II): M: Marker, JEC21, KN99α ve Aα *Cryptococcus kökeni* (1-7), (III): M: Marker, JEC20, KN99a ve Da *Cryptococcus kökeni* (1-7), (IV): M: Marker, JEC21, KN99α ve Dα *Cryptococcus kökeni* (1-7)

Tablo 7. *Cryptococcus* olduğu belirlenen örneklerde MAT Aa, MAT Aα, MAT Da, MAT Dα, SXI 2a, SXI 1α Oranları

	MAT Aa	MAT Aα	MAT Da	MAT Dα	SXI 2a	SXI 1α
<i>Cryptococcus</i> (n=97)	-	97 (%100)	-	-	-	-

5. TARTIŞMA

Cryptococcus türleri bazidiomycet sınıfından kapsüllü bir maya mantarı olup kriptokokkoz etkenidir. Doğada kolonize olan *C. neoformans*, özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda hayatı tehdit eden enfeksiyonlara neden olabilen kapsüllü bir maya mantarıdır [1].

MAT lokusu yüzyıllardan beri korunmuş olan bir bölgedir. MAT lokusu ile ilgili yapılmış olan çalışmalar gösteriyor ki bu lokus üzerindeki farklılıklar *C. neoformans*'ın virülansı ve ekolojisiyle ilgili bir bağlantının olup olmadığını anlamak için önemli bir faktördür [206].

Ülkemizde Denizli bölgesinde Şengül ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmaya göre *C. neoformans*'ın Akdeniz bölgesi koşullarına *C. gattii*'ye göre daha fazla uyum sağladığı görülmekte olup, *C. neoformans* çevresel örneklerden daha fazla izole edilmektedir [207]

Ergin ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada Türkiye'deki izolasyonlarının büyük bir kısmının Akdeniz ve Ege Bölgelerinde olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, Göksu Vadisi'nin de içinde olduğu birçok bölgede kolonizasyon olabileceği tespitine varmışlardır [208].

Şengül ve arkadaşlarının yapmış olduğu Denizli bölgesinde bulunan kestane (*Castanea spp.*) ağaçlarında *C. neoformans* varlığı araştırılmış olup çalışmaya göre A serotipinde MAT α genotipinde bir mayaya rastlamışlardır[207].

Ergin ve arkadaşlarının ülkemiz Ege Bölgesinde zeytin ve ökaliptus ağaçlarından yapmış olduğu bir başka çalışmada elde edilen izolatlarda ise; zeytin ağacından elde edilen örneklerde A serotipinde MAT α / α , D serotipinde ise α genotipinde maya bulunmuştur. Ökaliptus ağacındaki izolatlarda ise sadece D serotipinde α genotipine rastlamışlardır. Bu çalışmadaki izolatlardan hiçbirinde D serotipinde α genotipine ait bir maya identifiye etmemişlerdir [209].

Ergin ve arkadaşlarının ülkemizde yapmış olduğu çalışmada Güney Ege ve Akdeniz Bölgesindeki Toros dağlarında sadece bir tane *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* izolatını ökaliptus ağacından elde etmişlerdir [210].

2013 yılında Gökçen ve arkadaşları Muğla ili Milas ilçesinde bulunan ökaliptus ağaçlarından yaptıkları örnekleme sonucunda toplam 100 çevresel örnekte 3 tane *C. neoformans* identifiye etmiş olup, çalışmada *C. gattii* izolasyonuna rastlamamışlardır [211].

Cogliati ve arkadaşlarının 2012-2015 yılları arasında ilerinde İtalya, İspanya, Fransa, Türkiye, Hırvatistan, Portekiz, Almanya, Yunanistan, Kıbrıs, Libya ve İsrail’inde olduğu çalışmada toplanan 512 örnekten 474 tanesinin *C. neoformans* izolatı, 38 tanesinin ise *C. gattii* izolatı olduğunu bildirmişlerdir. D serotipinde a genotipinin Türkiye’de toplanan örneklere olduğunu bildirmişlerdir [212].

Bu alışmada, Akdeniz Bölgesinde çeşitli ağaçlardan toplanan çevresel örneklere *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* identifiye edilmiştir. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* ve *Cryptococcus gattii*’nin varlığına rastlanmamıştır.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Cryptococcus neoformans var. *grubii* ve *C. neoformans* var. *neoformans* dünya çapında bir dağılıma sahipken, *C. neoformans* var. *gattii* özellikle tropikal ve subtropikal bölgelerde daha sınırlı bir küresel dağılıma sahiptir [210]. Ülkemizde de güney ve güneybatı kıyı bölgeleri, tipik bir subtropikal iklim göstermektedir [210].

Ancak yapılan çalışmalarda yine de ağaçların biyokimyasal yapılarının *C. neoformans* için ne kadar uyumlu olup olmadığını tam olarak göz önüne koymamaktadır. Bu nedenle, çevresel etkenlerin *C. neoformans* üzerine olan etkilerinin değerlendirilmesi insanlarda bu denli önemli enfeksiyon meydana getiren bu maya için oldukça önemli olduğu öngörülmektedir [210].

Dolayısıyla, ülkemizde koloni izole edilen bölgelerin takiplerinin iyi yapıp bir risk haritasının belirli aralıklarda ortaya çıkarılması gerektiğini düşünmekteyiz. Çevresel örneklerden izole edilen *Cryptococcus* türlerinde eşeyli çoğalmada rol oynayan genlerin (MAT), virülans ve patogenezdaki rolleri anlaşıldıkça, mikropların tanısında ve farklı hedeflere yönelik yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi ve/veya mevcut tedavi yöntemlerinin yönlendirilmesine yol gösterici olacaktır.

KAYNAKLAR

- [1]. Lin X, Heitman J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. Ann Rev Microbiol 2006;60:69-105.
- [2]. Casadevall A, Perfect JR. *Cryptococcus neoformans*. Washington: ASM Press, 1998;81-121.
- [3]. Rosario I, Hermoso de Mendoza M, Déniz S, Soro G, Alamo I, Acosta B. Isolation of *Cryptococcus* species including *C. neoformans* from cloaca of pigeons. Mycoses 2005;48:421-424.
- [4]. Rosario I, Acosta B, Colom MF. Pigeons and other birds as a reservoir for *Cryptococcus* spp. Rev Iberoam Micol 2008;25:13-18
- [5]. Nielsen K, De Obaldia AL, Heitman J. *Cryptococcus neoformans* mates on pigeon guano: implications for the realized ecological niche and globalization. Eukaryot Cell 2007;6:949-959.
- [6]. Karaca Derici Y, Tümbay E. zmir l'inde doal ve klinik *Cryptococcus neoformans* kökenlerinin varyete ve serotipleri. Infek Derg 2008;22:53-58.
- [7]. Freeman, W. J. (1931). Torula infection of the central nervous system. J. Psychol. Neurol.43:236.
- [8]. Busse, O. (1894). Über parasitäre Zelleinschlüsse und ihre Züchtung. Zentralbl. Bakteriologie.16:175-180.
- [9]. Buschke, A. (1895). Über eine durch coccidien hervorge-rufene Krankheit des Menschen. Dtsch. Med. Wochenschr.21:14.
- [10]. Sanfelice, F. (1895) Über einen neuen Pathogen Blastomy-ceten welcher innerhalb der Gewebe unter Bildung, Kalkartig aussehender massendegeneriert. Zentralbl. Bak-teriologie. Parasit. Infekt. Hyg. 18:521-526.
- [11]. Vuillemin, J. P. (1901). Les blastomycetes pathogenes. Rev. Gen. Sci.12:732-751.
- [12]. Frothingham, L. A. (1902). A tumor-like lesion in the lung of a horse caused by a blastomyces (torula). J. Med Res. 3:31-43.
- [13]. Verse, M. (1914). Über einen Fall von general isofi erter Blastomyose beim Menschen. Dtsch. Pathol. Ges.17:275-278.
- [14]. Stoddard, J. L., & Cutler, E. C. (1916). Torula Infection in Man: A Group of Cases, Characterized by Chronic Lesions of the Central Nervous System, with Clinical Symptoms Suggestive of Cerebral Tumor, Produced by an Organism Belonging to the Torula Group (*Torula histolytica*, N. Sp.). Rockefeller Institute for Medical Research.
- [15]. Benham, R. W. (1935). *Cryptococci*: their identification by morphology and by serology. The Journal of infectious diseases, 255-274.
- [16]. Evans, E. E. (1949). An Immunologic Comparison of Twelve Strains of *Cryptococcus neoformans* (*Torula histolytica*). Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 71(4), 644-646.

- [17]. Vogel, R. A. (1966). The indirect fluorescent antibody test for the detection of antibody in human cryptococcal disease. *The Journal of infectious diseases*, 573-580.
- [18]. Kützing, F. (1833). Systematische Zusammenstellung der niedern Algen-gattungen und Arten. *Linnaea*, 8, 365.
- [19]. Lodder, J., & Kreger-Van, R. I. J. (1952). The yeasts-a taxonomic study. *The yeasts-a taxonomic study*.
- [20]. Phaff, H. J., & Spencer, J. F. T. (1969). Improved parameters in the separation of species in the genera *Rhodotorula* and *Cryptococcus*. In *Proc. II Symposium on Yeasts*, Bratislava (pp. 59-65).
- [21]. Rodrigues de Miranda, L. (1984). *Cryptococcus* Kützing emend. phaff et Spencer. *The yeasts, a taxonomic study*.
- [22]. Boekhout, T., Fonseca, A., Sampaio, J. P., Bandoni, R. J., Fell, J. W., & Kwon-Chung, K. J. (2011). Discussion of teleomorphic and anamorphic basidiomycetous yeasts. In *The Yeasts* (pp. 1339-1372). Elsevier.
- [23]. Kwon-Chung, K. J. (2010). *Filobasidiella* Kwon-Chung, p. 1443–1455. In C. P. Kurtzman, J. W. Fell, and T. Boek-hout (ed.), *The Yeasts: a Taxonomic Study*, 5th ed. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- [24]. Collins, H. L., & Bancroft, G. J. (1991). Encapsulation of *Cryptococcus neoformans* impairs antigen-specific T-cell responses. *Infection and immunity*, 59(11), 3883-3888.
- [25]. Dong, Z. M., & Murphy, J. W. (1995). Effects of the two varieties of *Cryptococcus neoformans* cells and culture filtrate antigens on neutrophil locomotion. *Infection and immunity*, 63(7), 2632-2644.
- [26]. Zaragoza, O., Chrisman, C. J., Castelli, M. V., Frases, S., Cuenca-Estrella, M., Rodríguez-Tudela, J. L., & Casadevall, A. (2008). Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. *Cellular microbiology*, 10(10), 2043-2057.
- [27]. Bhattacharjee, A. K., J. E. Bennett, and C. P. Glaudemans. (1984). Capsular polysaccharides of *Cryptococcus neoformans*. *Rev. Infect. Dis.* 6:619–624.
- [28]. McFadden, D. C., Fries, B. C., Wang, F., & Casadevall, A. (2007). Capsule structural heterogeneity and antigenic variation in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*, 6(8), 1464-1473.
- [29]. De Jesus, M., Nicola, A. M., Rodrigues, M. L., Janbon, G., & Casadevall, A. (2009). Capsular localization of the *Cryptococcus neoformans* polysaccharide component galactoxylomannan. *Eukaryotic cell*, 8(1), 96-103.
- [30]. Murphy, J. W. (1988). Influence of cryptococcal antigens on cell-mediated immunity. *Reviews of infectious diseases*, S432-S435.

- [31]. Cherniak, R., Valafar, H., Morris, L. C., & Valafar, F. (1998). *Cryptococcus neoformans* chemotyping by quantitative analysis of ¹H nuclear magnetic resonance spectra of glucuronoxylomannans with a computer-simulated artificial neural network. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 5(2), 146-159.
- [32]. Cherniak, R. 1988. Soluble polysaccharides of *Cryptococcus neoformans*. *Curr. Top. Med. Mycol.* 2:40-54.
- [33]. Casadevall, A., DeShaw, M., Fan, M., Dromer, F., Kozel, T. R., & Pirofski, L. A. (1994). Molecular and idiotypic analysis of antibodies to *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan. *Infection and immunity*, 62(9), 3864-3872.
- [34]. Casadevall, A., Mukherjee, J., Devi, S. J., Schneerson, R., Robbins, J. B., & Scharff, M. D. (1992). Antibodies elicited by a *Cryptococcus neoformans*-tetanus toxoid conjugate vaccine have the same specificity as those elicited in infection. *Journal of Infectious Diseases*, 165(6), 1086-1093.
- [35]. Nussbaum, G., Cleare, W., Casadevall, A., Scharff, M. D., & Valadon, P. (1997). Epitope location in the *Cryptococcus neoformans* capsule is a determinant of antibody efficacy. *Journal of Experimental Medicine*, 185(4), 685-694.
- [36]. Zaragoza, O., & Casadevall, A. (2004). Antibodies produced in response to *Cryptococcus neoformans* pulmonary infection in mice have characteristics of nonprotective antibodies. *Infection and immunity*, 72(7), 4271-4274.
- [37]. Heitman, J., Kozel, T. R., Kwon-Chung, K. J., Perfect, J. R., & Casadevall, A. (2010). *Cryptococcus: from human pathogen to model yeast*. ASM press.
- [38]. Kozel, T. R., Pfrommer, G. S., Guerlain, A. S., Highison, B. A., & Highison, G. J. (1988). Strain variation in phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*: dissociation of susceptibility to phagocytosis from activation and binding of opsonic fragments of C3. *Infection and immunity*, 56(11), 2794-2800.
- [39]. Zaragoza, O., Fries, B. C., & Casadevall, A. (2003). Induction of capsule growth in *Cryptococcus neoformans* by mammalian serum and CO₂. *Infection and immunity*, 71(11), 6155-6164.
- [40]. Littman, M. L. (1958). Capsule synthesis by *Cryptococcus neoformans*. *Transactions NY Acad. Sci.*, 20(7).
- [41]. Frases, S., Nimrichter, L., Viana, N. B., Nakouzi, A., & Casadevall, A. (2008). *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide and exopolysaccharide fractions manifest physical, chemical, and antigenic differences. *Eukaryotic cell*, 7(2), 319-327.
- [42]. Yoneda, A., & Doering, T. L. (2008). Regulation of *Cryptococcus neoformans* capsule size is mediated at the polymer level. *Eukaryotic cell*, 7(3), 546-549.

- [43]. Frases, S., Pontes, B., Nimrichter, L., Viana, N. B., Rodrigues, M. L., & Casadevall, A. (2009). Capsule of *Cryptococcus neoformans* grows by enlargement of polysaccharide molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(4), 1228-1233.
- [44]. Barreteau, H., Kovač, A., Boniface, A., Sova, M., Gobec, S., & Blanot, D. (2008). Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS microbiology reviews*, 32(2), 168-207.
- [45]. Reese, A. J., & Doering, T. L. (2003). Cell wall α -1, 3-glucan is required to anchor the *Cryptococcus neoformans* capsule. *Molecular microbiology*, 50(4), 1401-1409.
- [46]. Bacon, B. E., Cherniak, R., Kwon-Chung, K. J., & Jacobson, E. S. (1996). Structure of the O-deacetylated glucuronoxylomannan from *Cryptococcus neoformans* Cap70 as determined by 2D NMR spectroscopy. *Carbohydrate research*, 283, 95-110.
- [47]. Bahn, Y. S., Kojima, K., Cox, G. M., & Heitman, J. (2005). Specialization of the HOG pathway and its impact on differentiation and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Molecular biology of the cell*, 16(5), 2285-2300.
- [48]. Cherniak, R., Morris, L. C., Anderson, B. T., & Meyer, S. A. (1991). Facilitated isolation, purification, and analysis of glucuronoxylomannan of *Cryptococcus neoformans*. *Infection and immunity*, 59(1), 59-64
- [49]. Broekhuysse, R. M., Kuhlmann, E. D., & Winkens, H. J. (1992). Experimental autoimmune anterior uveitis (EAAU). II. Dose-dependent induction and adoptive transfer using a melanin-bound antigen of the retinal pigment epithelium. *Experimental eye research*, 55(3), 401-411.
- [50]. Broekhuysse, R. M., Kuhlmann, E. D., & Winkens, H. J. (1993). Experimental autoimmune anterior uveitis (EAAU): induction by melanin antigen and suppression by various treatments. *Pigment cell research*, 6(1), 1-6.
- [51]. Staib, F. (1962). *Cyptococcus neoformans* und *Guizotia abyssinica* (syn. *G. oleifera* DC). *Medical Microbiology and Immunology*, 148(5), 466-475.
- [52]. Zhu, X., & Williamson, P. R. (2004). Role of laccase in the biology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *FEMS yeast research*, 5(1), 1-10.
- [53]. Torres-Guererro, H., & Edman, J. C. (1994). Melanin-deficient mutants of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of medical and veterinary mycology*, 32(4), 303-313.
- [54]. Wakamatsu, K., & Ito, S. (2002). Advanced chemical methods in melanin determination. *Pigment Cell Research*, 15(3), 174-183.
- [55]. Dadachova, E., Bryan, R. A., Howell, R. C., Schweitzer, A. D., Aisen, P., Nosanchuk, J. D., & Casadevall, A. (2008). The radioprotective properties of fungal melanin are a function of its chemical composition, stable radical presence and spatial arrangement. *Pigment cell & melanoma research*, 21(2), 192-199.

- [56]. Franzot, S. P., Mukherjee, J., Cherniak, R., Chen, L. C., Hamdan, J. S., & Casadevall, A. (1998). Microevolution of a Standard Strain of *Cryptococcus neoformans* Resulting in Differences in Virulence and Other Phenotypes. *Infection and Immunity*, 66(1), 89-97.
- [57]. Ikeda, R., Shinoda, T., Morita, T., & Jacobson, E. S. (1993). Characterization of a phenol oxidase from *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. *Microbiology and immunology*, 37(10), 759-764.
- [58]. Nurudeen, T. A., & Ahearn, D. G. (1979). Regulation of melanin production by *Cryptococcus neoformans*. *Journal of clinical Microbiology*, 10(5), 724-729.
- [59]. Walton, F. J., Idnurm, A., & Heitman, J. (2005). Novel gene functions required for melanization of the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Molecular microbiology*, 57(5), 1381-1396.
- [60]. Jacobson, E. S., Goodner, A. P., & Nyhus, K. J. (1998). Ferrous iron uptake in *Cryptococcus neoformans*. *Infection and immunity*, 66(9), 4169-4175.
- [61]. Pierini, L. M., & Doering, T. L. (2001). Spatial and temporal sequence of capsule construction in *Cryptococcus neoformans*. *Molecular microbiology*, 41(1), 105-115.
- [62]. Garcia-Rivera, J., & Casadevall, A. (2001). Melanization of *Cryptococcus neoformans* reduces its susceptibility to the antimicrobial effects of silver nitrate. *Sabouraudia*, 39(4), 353-357.
- [63]. Bunting, L. A., Neilson, J. B., & Bulmer, G. S. (1979). *Cryptococcus neoformans*: gastronomic delight of a soil amoeba. *Sabouraudia*, 17(3), 225-232.
- [64]. Kuo, M. J., & Alexander, M. (1967). Inhibition of the lysis of fungi by melanins. *Journal of Bacteriology*, 94(3), 624-629.
- [65]. Sinilova, N. G., Pershina, Z. G., Duplitseva, A. P., & Pavlova, I. B. (1969). A radio-resistant pigmented bacterial culture isolated from atomic reactor water. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, i immunobiologii*, 46(8), 94.
- [66]. Nosanchuk, J. D., & Casadevall, A. (2006). Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(11), 3519-3528.
- [67]. Casadevall, A., A. L. Rosas, and J. D. Nosanchuk. 2000. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Curr. Opin. Microbiol.*3:354–358.
- [68]. Martinez, L. R., & Casadevall, A. (2006). Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(3), 1021-1033.
- [69]. Wang, Y., & Casadevall, A. (1994). Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to nitrogen and oxygen derived oxidants. *Infection and immunity*, 62(7), 3004-3007.

- [70]. Wang, Y., & Casadevall, A. (1996). Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to the melanin-binding compounds trifluoperazine and chloroquine. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 40(3), 541-545.
- [71]. Huffnagle, G. B., Chen, G. H., Curtis, J. L., McDonald, R. A., Strieter, R. M., & Toews, G. B. (1995). Down-regulation of the afferent phase of T cell-mediated pulmonary inflammation and immunity by a high melanin-producing strain of *Cryptococcus neoformans*. *The Journal of Immunology*, 155(7), 3507-3516.
- [72]. Rosas, A. L., MacGill, R. S., Nosanchuk, J. D., Kozel, T. R., & Casadevall, A. (2002). Activation of the alternative complement pathway by fungal melanins. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 9(1), 144-148.
- [73]. Ikeda, R., Sugita, T., Jacobson, E. S., & Shinoda, T. (2003). Effects of melanin upon susceptibility of *Cryptococcus* to antifungals. *Microbiology and immunology*, 47(4), 271-277.
- [74]. James, P. G., Cherniak, R., Jones, R. G., Stortz, C. A., & Reiss, E. (1990). Cell-wall glucans of *Cryptococcus neoformans* Cap 67. *Carbohydrate research*, 198(1), 23-38.
- [75]. Banks, I. R., Specht, C. A., Donlin, M. J., Gerik, K. J., Levitz, S. M., & Lodge, J. K. (2005). A chitin synthase and its regulator protein are critical for chitosan production and growth of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*, 4(11), 1902-1912.
- [76]. Fleet, G. H. (1985). Composition and structure of yeast cell walls. In *Current topics in medical mycology* (pp. 24-56). Springer, New York, NY.
- [77]. Klis, F. M., Mol, P., Hellingwerf, K., & Brul, S. (2002). Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS microbiology reviews*, 26(3), 239-256.
- [78]. Bartizal, K., Gill, C. J., Abruzzo, G. K., Flattery, A. M., Kong, L. I., Scott, P. M., ... & Balkovec, J. (1997). In vitro preclinical evaluation studies with the echinocandin antifungal MK-0991 (L-743,872). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(11), 2326-2332.
- [79]. Thompson, J. R., Douglas, C. M., Li, W., Jue, C. K., Pramanik, B., Yuan, X., ... & Kurtz, M. (1999). A Glucan Synthase FKS1 Homolog in *Cryptococcus neoformans* Is Single Copy and Encodes an Essential Function. *Journal of Bacteriology*, 181(2), 444-453.
- [80]. Minke, R., and J. Blackwell. 1978. The structure of alpha-chitin. *J. Mol. Biol.* 120:167-181.
- [81]. Christodoulidou, A., Bouriotis, V., & Thireos, G. (1996). Two sporulation-specific chitin deacetylase-encoding genes are required for the ascospore wall rigidity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 271(49), 31420-31425.
- [82]. White, S. A., Farina, P. R., & Fulton, I. (1979). Production and isolation of chitosan from *Mucor rouxii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 38(2), 323-328.
- [83]. Araki, Y., & Ito, E. (1975). A pathway of chitosan formation in *Mucor rouxii*: enzymatic deacetylation of chitin. *European Journal of Biochemistry*, 55(1), 71-78.

- [84]. Banks, I. R., Specht, C. A., Donlin, M. J., Gerik, K. J., Levitz, S. M., & Lodge, J. K. (2005). A chitin synthase and its regulator protein are critical for chitosan production and growth of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*, 4(11), 1902-1912.
- [85]. Reese, A. J., Yoneda, A., Breger, J. A., Beauvais, A., Liu, H., Griffith, C. L., ... & Sefko, J. A. (2007). Loss of cell wall alpha (1-3) glucan affects *Cryptococcus neoformans* from ultrastructure to virulence. *Molecular microbiology*, 63(5), 1385-1398.
- [86]. Williamson, P. R. (1994). Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a laccase. *Journal of bacteriology*, 176(3), 656-664.
- [87]. Eisenman, H. C., Nosanchuk, J. D., Webber, J. B. W., Emerson, R. J., Camesano, T. A., & Casadevall, A. (2005). Microstructure of cell wall-associated melanin in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Biochemistry*, 44(10), 3683-3693.
- [88]. Baker, L. G., Specht, C. A., & Lodge, J. K. (2009). Chitinases are essential for sexual development but not vegetative growth in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic cell*, 8(11), 1692-1705.
- [89]. Chen, S. C., Muller, M., Zhou, J. Z., Wright, L. C., & Sorrell, T. C. (1997). Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*: a new virulence factor. *Journal of Infectious Diseases*, 175(2), 414-420.
- [90]. Chen, S. C., Wright, L. C., Santangelo, R. T., Muller, M., Moran, V. R., Kuchel, P. W., & Sorrell, T. C. (1997). Identification of extracellular phospholipase B, lysophospholipase, and acyltransferase produced by *Cryptococcus neoformans*. *Infection and immunity*, 65(2), 405-411.
- [91]. Djordjevic, J. T., Del Poeta, M., Sorrell, T. C., Turner, K. M., & Wright, L. C. (2005). Secretion of cryptococcal phospholipase B1 (PLB1) is regulated by a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor. *Biochemical Journal*, 389(3), 803-812.
- [92]. Salas, S. D., Bennett, J. E., Kwon-Chung, K. J., Perfect, J. R., & Williamson, P. R. (1996). Effect of the laccase gene CNLAC1, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Experimental Medicine*, 184(2), 377-386.
- [93]. Kwon-Chung, K. J. (1976). A new species of *Filobasidiella*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes. *Mycologia*, 68(4), 942-946.
- [94]. Kwon-Chung, K. J. (1976). Morphogenesis of *Filobasidiella neoformans*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia*, 68(4), 821-833.
- [95]. Hull, C. M., Boily, M. J., & Heitman, J. (2005). Sex-specific homeodomain proteins Sxi1 α and Sxi2a coordinately regulate sexual development in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic cell*, 4(3), 526-535.
- [96]. Kwon-Chung, K. J., Edman, J. C., & Wickes, B. L. (1992). Genetic association of mating types and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infection and immunity*, 60(2), 602-605.

- [97]. Clements Jr, R. S., & Darnell, B. (1980). Myo-inositol content of common foods: development of a high-myo-inositol diet. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 33(9), 1954-1967.
- [98]. Bahn, Y. S., Xue, C., Idnurm, A., Rutherford, J. C., Heitman, J., & Cardenas, M. E. (2007). Sensing the environment: lessons from fungi. *Nature Reviews Microbiology*, 5(1), 57.
- [99]. Bahn, Y. S., Cox, G. M., Perfect, J. R., & Heitman, J. (2005). Carbonic anhydrase and CO₂ sensing during *Cryptococcus neoformans* growth, differentiation, and virulence. *Current Biology*, 15(22), 2013-2020.
- [100]. Staib, F., & Blisse, A. (1982). Bird manure filtrate agar for the formation of the perfect state of *Cryptococcus neoformans*, *Filobasidiella neoformans*. A comparative study of the agars prepared from pigeon and canary manure. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. 1. Abt. Originale. A, Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten und Parasitologie*, 251(4), 554-562.
- [101]. Nielsen, K., De Obaldia, A. L., & Heitman, J. (2007). *Cryptococcus neoformans* mates on pigeon guano: implications for the realized ecological niche and globalization. *Eukaryotic cell*, 6(6), 949-959.
- [102]. Anderson, C. M., Willits, D. A., Ksted, P. J., Ford, E. J., Martinez-Espinoza, A. D., & Sherwood, J. E. (1999). Molecular analysis of the pheromone and pheromone receptor genes of *Ustilago hordei*. *Gene*, 240(1), 89-97.
- [103]. Bölker, M., Urban, M., & Kahmann, R. (1992). The a mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. *Cell*, 68(3), 441-450.
- [104]. Kavanaugh, L. A., Fraser, J. A., & Dietrich, F. S. (2006). Recent evolution of the human pathogen *Cryptococcus neoformans* by intervarietal transfer of a 14-gene fragment. *Molecular biology and evolution*, 23(10), 1879-1890.
- [105]. Kwon-Chung, K. J., & Bennett, J. E. (1984). Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *American journal of epidemiology*, 120(1), 123-130.
- [106]. Litvintseva, A. P., L. Kestenbaum, R. J. Vilgalys, and T. G. Mitchell. 2005. Comparative analysis of environmental and clinical populations of *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Microbiol.*43:556–564.
- [107]. Abraham, M., Matthews, M. S., & John, T. J. (1997). Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from Vellore. *The Indian journal of medical research*, 106, 458-459.
- [108]. Fiskin, A. M., Zalles, M. C., & Garrison, R. G. (1990). Electron cytochemical studies of *Cryptococcus neoformans* grown on uric acid and related sources of nitrogen. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 28(3), 197-207.
- [109]. Garcia-Rivera, J., & Casadevall, A. (2001). Melanization of *Cryptococcus neoformans* reduces its susceptibility to the antimicrobial effects of silver nitrate. *Sabouraudia*, 39(4), 353-357.

- [110]. WALTER, J. E., & YEE, R. B. (1968). Factors that determine the growth of *Cryptococcus neoformans* in avian excreta. *American journal of epidemiology*, 88(3), 445-450.
- [111]. Baroni, F. D. A., Paula, C. R., Silva, É. G. D., Viani, F. C., Rivera, I. N., Oliveira, M. T. B. D., & Gambale, W. (2006). *Cryptococcus neoformans* strains isolated from church towers in Rio de Janeiro City, RJ, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 48(2), 71-75.
- [112]. Ruiz, A., Vélez, D., & Fromtling, R. A. (1989). Isolation of saprophytic *Cryptococcus neoformans* from Puerto Rico: distribution and variety. *Mycopathologia*, 106(3), 167-170.
- [113]. Heitman, J., Casadevall, A., Lodge, J. K., & Perfect, J. R. (1999). The *Cryptococcus neoformans* genome sequencing project. *Mycopathologia*, 148(1), 1.
- [114]. Loftus, B. J., Fung, E., Roncaglia, P., Rowley, D., Amedeo, P., Bruno, D., ... & Allen, J. E. (2005). The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Science*, 307(5713), 1321-1324.
- [115]. Salas, S. D., Bennett, J. E., Kwon-Chung, K. J., Perfect, J. R., & Williamson, P. R. (1996). Effect of the laccase gene *CNLAC1*, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Experimental Medicine*, 184(2), 377-386.
- [116]. Nielsen, K., Marra, R. E., Hagen, F., Boekhout, T., Mitchell, T. G., Cox, G. M., & Heitman, J. (2005). Interaction between genetic background and the mating-type locus in *Cryptococcus neoformans* virulence potential. *Genetics*, 171(3), 975-983.
- [117]. Lengeler, K. B., Wang, P., Cox, G. M., Perfect, J. R., & Heitman, J. (2000). Identification of the *MATa* mating-type locus of *Cryptococcus neoformans* reveals a serotype A *MATa* strain thought to have been extinct. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(26), 14455-14460.
- [118]. Litvintseva, A. P., Marra, R. E., Nielsen, K., Heitman, J., Vilgalys, R., & Mitchell, T. G. (2003). Evidence of sexual recombination among *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates in sub-Saharan Africa. *Eukaryotic cell*, 2(6), 1162-1168.
- [119]. Viviani, M. A., Esposto, M. C., Cogliati, M., Montagna, M. T., & Wickes, B. L. (2001). Isolation of a *Cryptococcus neoformans* serotype A *MATa* strain from the Italian environment. *Medical mycology*, 39(5), 383-386.
- [120]. Butler, G. (2007). The evolution of *MAT*: the ascomycetes. In *Sex in Fungi* (pp. 3-18). American Society of Microbiology.
- [121]. Litvintseva, A. P., Marra, R. E., Nielsen, K., Heitman, J., Vilgalys, R., & Mitchell, T. G. (2003). Evidence of sexual recombination among *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates in sub-Saharan Africa. *Eukaryotic cell*, 2(6), 1162-1168.
- [122]. Kwon-Chung, K. J., Edman, J. C., & Wickes, B. L. (1992). Genetic association of mating types and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infection and immunity*, 60(2), 602-605.

- [123]. Nielsen, K., Cox, G. M., Litvintseva, A. P., Mylonakis, E., Malliaris, S. D., Benjamin, D. K., ... & Heitman, J. (2005). *Cryptococcus neoformans* α strains preferentially disseminate to the central nervous system during coinfection. *Infection and immunity*, 73(8), 4922-4933.
- [124]. Moore, T. D., & Edman, J. C. (1993). The alpha-mating type locus of *Cryptococcus neoformans* contains a peptide pheromone gene. *Molecular and Cellular Biology*, 13(3), 1962-1970.
- [125]. Karos, M., Chang, Y. C., McClelland, C. M., Clarke, D. L., Fu, J., Wickes, B. L., & Kwon-Chung, K. J. (2000). Mapping of the *Cryptococcus neoformans* MAT α locus: presence of mating type-specific mitogen-activated protein kinase cascade homologs. *Journal of bacteriology*, 182(21), 6222-6227.
- [126]. Wang, S. W., Toda, T., MacCallum, R., Harris, A. L., & Norbury, C. (2000). Cid1, a fission yeast protein required for SM checkpoint control when DNA polymerase δ or ϵ is inactivated. *Molecular and Cellular Biology*, 20(9), 3234-3244.
- [127]. Buschke, A. (1895). Über eine durch Coccidien Hervergerufene Krankheit des menschen. *Deutsche Med Wochenschr*, 21, 14.
- [128]. Littman, M. L., & Walter, J. E. (1968). Cryptococcosis: current status. *The American journal of medicine*, 45(6), 922-932.
- [129]. Mitchell, T. G., & Perfect, J. R. (1995). Cryptococcosis in the era of AIDS--100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clinical microbiology reviews*, 8(4), 515-548.
- [130]. Abadi, J., S. Nachman, A. B. Kressel, and L.-A. Pirofski. 1999. Cryptococcosis in children with AIDS. *Clin. Infect. Dis.*28:309–313.
- [131]. Staib, F. (1962). *Cryptococcus neoformans* und *Guizotia abyssinica* (syn. *G. oleifera* DC). *Medical Microbiology and Immunology*, 148(5), 466-475.
- [132]. Kwon-Chung, K. J. (1992). Bennett. *Medical Mycology*. Ed Philadelphia, PA.
- [133]. Nosanchuk, J. D., & Casadevall, A. (2003). The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cellular microbiology*, 5(4), 203-223.
- [134]. Zhu, X., & Williamson, P. R. (2004). Role of laccase in the biology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *FEMS yeast research*, 5(1), 1-10.
- [135]. Garcia-Rivera, J., & Casadevall, A. (2001). Melanization of *Cryptococcus neoformans* reduces its susceptibility to the antimicrobial effects of silver nitrate. *Sabouraudia*, 39(4), 353-357.
- [136]. Steenbergen, J. N., Shuman, H. A., & Casadevall, A. (2001). *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(26), 15245-15250.
- [137]. Kidd, S. E., Chow, Y., Mak, S., Bach, P. J., Chen, H., Hingston, A. O., ... & Bartlett, K. H. (2007). Characterization of environmental sources of the human and animal pathogen *Cryptococcus*

gattii in British Columbia, Canada, and the Pacific Northwest of the United States. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(5), 1433-1443.

[138]. Litvintseva, A. P., L. Kestenbaum, R. J. Vilgalys, and T. G. Mitchell. 2005. Comparative analysis of environmental and clinical populations of *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Microbiol.* 43:556–564.

[139]. Marra, R. E., Huang, J. C., Fung, E., Nielsen, K., Heitman, J., Vilgalys, R., & Mitchell, T. G. (2004). A genetic linkage map of *Cryptococcus neoformans* variety *neoformans* serotype D (*Filobasidiella neoformans*). *Genetics*, 167(2), 619-631.

[140]. Byrnes III, E. J., Bildfell, R. J., Frank, S. A., Mitchell, T. G., Marr, K. A., & Heitman, J. (2009). Molecular evidence that the range of the Vancouver Island outbreak of *Cryptococcus gattii* infection has expanded into the Pacific Northwest in the United States. *The Journal of infectious diseases*, 199(7), 1081-1086.

[141]. Aberg, J. A., Mundy, L. M., & Powderly, W. G. (1999). Pulmonary cryptococcosis in patients without HIV infection. *Chest*, 115(3), 734-740.

[142]. Cogliati, M., Esposto, M. C., Lemmer, K., Tintelnot, K., & Savoldelli, M. A. (2005). A 30-month ECMM survey of cryptococcosis in Europe: Molecular analysis of 316 *Cryptococcus neoformans* isolates. In *International Conference of Cryptococcus and Cryptococcosis* (p. 118). Boston University school of medicine.

[143]. Nadrous, H. F., V. S. Antonios, C. L. Terrell, and J. H. Ryu. 2003. Pulmonary cryptococcosis in nonimmuno-compromised patients. *Chest* 124:2143–2147.

[144]. Torfoss, D., & Sandven, P. (2005). Invasive fungal infections at The Norwegian Radium Hospital 1998–2003. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 37(8), 585-589.

[145]. Tsinzerling, V. A., Komarova, D. V., Vasil'eva, M. V., & Karev, V. E. (2003). Pathological anatomy of HIV infection according to data in Saint-Petersburg. *Arkhiv patologii*, 65(1), 42-45.

[146]. Grover, N., Nawange, S. R., Naidu, J., Singh, S. M., & Sharma, A. (2007). Ecological niche of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* in decaying wood of trunk hollows of living trees in Jabalpur City of Central India. *Mycopathologia*, 164(4), 159-170.

[147]. Gugnani, H. C., Mitchell, T. G., Litvintseva, A. P., Lengeler, K. B., Heitman, J., Kumar, A., ... & Paliwal-Joshi, A. (2005). Isolation of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* from the flowers and bark of Eucalyptus trees in India. *Medical Mycology*, 43(6), 565-569.

[148]. Callejas, A., Ordonez, N., Rodriguez, M. C., & Castaneda, E. (1998). First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, serotype C, from the environment in Colombia. *Medical mycology*, 36(5), 341-344.

[149]. Granados, D. P., & Castañeda, E. (2006). Influence of climatic conditions on the isolation of members of the *Cryptococcus neoformans* species complex from trees in Colombia from 1992–2004. *FEMS yeast research*, 6(4), 636-644.

- [150]. Litvintseva, A. P., Mitchell, T. G., & Govender, N. (2009). Out-of-Africa origin of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A). In 17th Congress, International Society for Human and Animal Mycology, Abstract EP-04-2 (Vol. 205).
- [151]. Nishikawa, M. M., Lazera, M. S., Barbosa, G. G., Trilles, L., Balassiano, B. R., Macedo, R. C., ... & Wanke, B. (2003). Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. *Journal of clinical microbiology*, 41(1), 73-77.
- [152]. Randhawa, H. S., Kowshik, T., Chowdhary, A., Preeti Sinha, K., Khan, Z. U., Sun, S., & Xu, J. (2008). The expanding host tree species spectrum of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* and their isolations from surrounding soil in India. *Sabouraudia*, 46(8), 823-833.
- [153]. Refojo, N., Perrotta, D., Brudny, M., Abrantes, R., Hevia, A. I., & Davel, G. (2009). Isolation of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from trunk hollows of living trees in Buenos Aires City, Argentina. *Medical mycology*, 47(2), 177-184.
- [154]. Reimao, J. Q., Drummond, E. D., Terceti, M. D. S., Lyon, J. P., Franco, M. C., & De Siqueira, A. M. (2007). Isolation of *Cryptococcus neoformans* from hollows of living trees in the city of Alfenas, MG, Brazil. *Mycoses*, 50(4), 261-264.
- [155]. Sriburee, P., Khayhan, S., Khamwan, C., Panjaisee, S., & Tharavichitkul, P. (2004). Serotype and PCR-fingerprints of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* in Chiang Mai, Thailand. *Mycopathologia*, 158(1), 25-31.
- [156]. Datta, K., Bartlett, K. H., Baer, R., Byrnes, E., Galanis, E., Heitman, J., ... & Morshed, M. G. (2009). Spread of *Cryptococcus gattii* into Pacific Northwest region of the United States. *Emerging infectious diseases*, 15(8), 1185.
- [157]. Dos Santos, W. R., W. Meyer, B. Wanke, S. P. Costa, L. Trilles, J. L. M. Nascimento, R. Medeiros, B. P. Mo-ralles, C. C. F. Bezerra, R. C. de Macêdo, S. O. Ferreira, G. G. Barbosa, M. A. Perez, M. M. Nishikawa, and M. S. Lazéra. 2008. Primary endemic *Cryptococcosis gattii* by molecular type VGII in the state of Pará, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 103:813–818.
- [158]. Baroni, F. D. A., Paula, C. R., Silva, É. G. D., Viani, F. C., Rivera, I. N., Oliveira, M. T. B. D., & Gambale, W. (2006). *Cryptococcus neoformans* strains isolated from church towers in Rio de Janeiro City, RJ, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 48(2), 71-75.
- [159]. Litvintseva, A. P., Thakur, R., Reller, L. B., & Mitchell, T. G. (2005). Prevalence of clinical isolates of *Cryptococcus gattii* serotype C among patients with AIDS in Sub-Saharan Africa. *The Journal of infectious diseases*, 192(5), 888-892.
- [160]. Morgan, J., McCarthy, K. M., Gould, S., Fan, K., Arthington-Skaggs, B., Iqbal, N., ... & Gauteng Cryptococcal Surveillance Initiative Group. (2006). *Cryptococcus gattii* infection: characteristics and epidemiology of cases identified in a South African province with high HIV seroprevalence, 2002–2004. *Clinical infectious diseases*, 43(8), 1077-1080.

- [161]. Baró, T., Torres-Rodríguez, J. M., De Mendoza, M. H., Morera, Y., & Alía, C. (1998). First Identification of Autochthonous *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* Isolated from Goats with Predominantly Severe Pulmonary Disease in Spain. *Journal of clinical microbiology*, 36(2), 458-461.
- [162]. Velegraki, A., Kiosses, V. G., Pitsouni, H., Toukas, D., Daniilidis, V. D., & Legakis, N. J. (2001). First report of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* serotype B from Greece. *Medical mycology*, 39(5), 419-422.
- [163]. Campbell, L. T., Currie, B. J., Krockenberger, M., Malik, R., Meyer, W., Heitman, J., & Carter, D. (2005). Clonality and recombination in genetically differentiated subgroups of *Cryptococcus gattii*. *Eukaryotic cell*, 4(8), 1403-1409.
- [164]. Chen, S. C. A., Currie, B. J., Campbell, H. M., Fisher, D. A., Pfeiffer, T. J., Ellis, D. H., & Sorrell, T. C. (1997). *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* infection in northern Australia: existence of an environmental source other than known host eucalypts. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 91(5), 547-550.
- [165]. Sorrell, T. C., Chen, S. C., Ruma, P., Meyer, W., Pfeiffer, T. J., Ellis, D. H., & Brownlee, A. G. (1996). Concordance of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* by random amplification of polymorphic DNA analysis and PCR fingerprinting. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(5), 1253-1260.
- [166]. McGill, S., Malik, R., Saul, N., Beetson, S., Secombe, C., Robertson, I., & Irwin, P. (2009). Cryptococcosis in domestic animals in Western Australia: a retrospective study from 1995–2006. *Medical mycology*, 47(6), 625-639.
- [167]. Ellis, D. H., and T. J. Pfeiffer. 1992. The ecology of *Cryptococcus neoformans*. *Eur. J. Epidemiol.* 8:321–325.
- [168]. Sorrell, T. C. (2001). *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. *Medical mycology*, 39(2), 155-168.
- [169]. McCarthy, K. M., Morgan, J., Wannemuehler, K. A., Mirza, S. A., Gould, S. M., Mhlongo, N., ... & Hajjeh, R. A. (2006). Population-based surveillance for cryptococcosis in an antiretroviral-naive South African province with a high HIV seroprevalence. *Aids*, 20(17), 2199-2206.
- [170]. Desmet, P., Kayembe, K. D., & De, C. V. (1989). The value of cryptococcal serum antigen screening among HIV-positive/AIDS patients in Kinshasa, Zaire. *AIDS (London, England)*, 3(2), 77-78.
- [171]. UNAIDS. 2006. 2006 Report on the Global AIDS Epidemic. <http://www.unaids.org/en/KnowledgeCentre/Resources/Publications/> [Online.]
- [172]. Kumarasamy, N., Solomon, S., Flanigan, T. P., Hemalatha, R., Thyagarajan, S. P., & Mayer, K. H. (2003). Natural history of human immunodeficiency virus disease in southern India. *Clinical Infectious Diseases*, 36(1), 79-85.

- [173]. Vajpayee, M., Kanswal, S., Seth, P., & Wig, N. (2003). Spectrum of opportunistic infections and profile of CD4+ counts among AIDS patients in North India. *Infection*, 31(5), 336-340.
- [174]. Lakshmi, V., Sudha, T., Teja, V. D., & Umabala, P. (2007). Prevalence of central nervous system cryptococcosis in human immunodeficiency virus reactive hospitalized patients. *Indian journal of medical microbiology*, 25(2), 146.
- [175]. Chariyalertsak, S., Sirisanthana, T., Saengwonloey, O., & Nelson, K. E. (2001). Clinical presentation and risk behaviors of patients with acquired immunodeficiency syndrome in Thailand, 1994–1998: regional variation and temporal trends. *Clinical infectious diseases*, 32(6), 955-962
- [176]. Amornkul, P. N., Hu, D. J., Tansuphasawadikul, S., Lee, S., Eampokalap, B., Likanonsakul, S., ... & Mastro, T. D. (2003). Human immunodeficiency virus type 1 subtype and other factors associated with extrapulmonary Cryptococcosis among patients in Thailand with AIDS. *AIDS research and human retroviruses*, 19(2), 85-90.
- [177]. Inverarity, D., Bradshaw, Q., Wright, P., & Grant, A. (2002). The spectrum of HIV-related disease in rural Central Thailand. *Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, 33(4), 822-831
- [178]. Mirza, S. A., Phelan, M., Rimland, D., Graviss, E., Hamill, R., Brandt, M. E., ... & Hajjeh, R. A. (2003). The changing epidemiology of cryptococcosis: an update from population-based active surveillance in 2 large metropolitan areas, 1992–2000. *Clinical infectious diseases*, 36(6), 789-794.
- [179]. San-Andrés, F. J., Rubio, R., Castilla, J., Pulido, F., Palao, G., de Pedro, I., ... & del Palacio, A. (2003). Incidence of acquired immunodeficiency syndrome-associated opportunistic diseases and the effect of treatment on a cohort of 1115 patients infected with human immunodeficiency virus, 1989–1997. *Clinical infectious diseases*, 36(9), 1177-1185.
- [180]. Kim, J. M., Cho, G. J., Hong, S. K., Chang, K. H., Chung, J. S., Choi, Y. H., ... & Choi, J. Y. (2003). Epidemiology and clinical features of HIV infection/AIDS in Korea. *Yonsei medical journal*, 44(3), 363-370.
- [181]. Oh, M. D., Park, S. W., Kim, H. B., Kim, U. S., Kim, N. J., Choi, H. J., ... & Choe, K. (1999). Spectrum of opportunistic infections and malignancies in patients with human immunodeficiency virus infection in South Korea. *Clinical infectious diseases*, 29(6), 1524-1528
- [182]. Dore, G. J., Li, Y., McDonald, A., Ree, H., & Kaldor, J. M. (2002). Impact of highly active antiretroviral therapy on individual AIDS-defining illness incidence and survival in Australia. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*, 29(4), 388-395.
- [183]. Dore, G. J., Li, Y., McDonald, A., Ree, H., & Kaldor, J. M. (2002). Impact of highly active antiretroviral therapy on individual AIDS-defining illness incidence and survival in Australia. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*, 29(4), 388-395.

- [184]. Park, B. J., Wannemuehler, K. A., Marston, B. J., Govender, N., Pappas, P. G., & Chiller, T. M. (2009). Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *Aids*, 23(4), 525-530.
- [185]. Chen, S., Sorrell, T., Nimmo, G., Speed, B., Currie, B., Ellis, D., ... & Byth, K. (2000). Epidemiology and host-and variety-dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. *Clinical infectious diseases*, 31(2), 499-508.
- [186]. Fisher, D., Burrow, J., Lo, D., & Currie, B. (1993). *Cryptococcus neoformans* in tropical northern Australia: predominantly variant *gattii* with good outcomes. *Australian and New Zealand journal of medicine*, 23(6), 678-682.
- [187]. Kwon-Chung, K. J., & Bennett, J. E. (1984). Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *American journal of epidemiology*, 120(1), 123-130.
- [188]. Laurenson, I. F., Trevett, A. J., Lalloo, D. G., Nwokolo, N., Naraqi, S., Black, J., ... & Warrell, D. A. (1996). Meningitis caused by *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* and var. *neoformans* in Papua New Guinea. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 90(1), 57-60.
- [189]. Nishikawa, M. M., Lazera, M. S., Barbosa, G. G., Trilles, L., Balassiano, B. R., Macedo, R. C., ... & Wanke, B. (2003). Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. *Journal of clinical microbiology*, 41(1), 73-77.
- [190]. Rozenbaum, R., Gonçalves, A. J. R., Wanke, B., Caiuby, M. J., Clemente, H., dos Santos Lazera, M., ... & Londero, A. T. (1992). *Cryptococcus neoformans* varieties as agents of cryptococcosis in Brazil. *Mycopathologia*, 119(3), 133-136.
- [191]. Colom, M. F., Frasés, S., Ferrer, C., Jover, A., Andreu, M., Reus, S., ... & Torres-Rodríguez, J. M. (2005). First case of human cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Spain. *Journal of clinical microbiology*, 43(7), 3548-3550.
- [192]. Sorrell, T. C. (2001). *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. *Medical mycology*, 39(2), 155-168.
- [193]. Velegraki, A., Kiosses, V. G., Pitsouni, H., Toukas, D., Daniilidis, V. D., & Legakis, N. J. (2001). First report of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* serotype B from Greece. *Medical mycology*, 39(5), 419-422.
- [194]. Datta, K., Bartlett, K. H., & Marr, K. A. (2009). *Cryptococcus gattii*: emergence in western North America: exploitation of a novel ecological niche. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*, 2009.
- [195]. Kidd, S. E., Hagen, F., Tschärke, R. L., Huynh, M., Bartlett, K. H., Fyfe, M., ... & Meyer, W. (2004). A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver

Island (British Columbia, Canada). Proceedings of the national academy of sciences, 101(49), 17258-17263.

[196]. MacDougall, L., Kidd, S. E., Galanis, E., Mak, S., Leslie, M. J., Cieslak, P. R., ... & Bartlett, K. H. (2007). Spread of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and detection in the Pacific Northwest, USA. *Emerging infectious diseases*, 13(1), 42.

[197]. Stephen, C., Lester, S., Black, W., Fyfe, M., & Raverty, S. (2002). British Columbia: Multispecies outbreak of cryptococcosis on southern Vancouver Island, British Columbia. *The Canadian Veterinary Journal*, 43(10), 792.

[198]. Speed, B., & Dunt, D. (1995). Clinical and host differences between infections with the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Clinical infectious diseases*, 21(1), 28-34.

[199]. Chaturvedi, S., Dyavaiah, M., Larsen, R. A., & Chaturvedi, V. (2005). *Cryptococcus gattii* in AIDS patients, southern California. *Emerging infectious diseases*, 11(11), 1686.

[200]. Chen, J., Varma, A., Diaz, M. R., Litvintseva, A. P., Wollenberg, K. K., & Kwon-Chung, K. J. (2008). *Cryptococcus neoformans* strains and infection in apparently immunocompetent patients, China. *Emerging infectious diseases*, 14(5), 755.

[201]. Jenney, A., Pandithage, K., Fisher, D. A., & Currie, B. J. (2004). *Cryptococcus* infection in tropical Australia. *Journal of clinical microbiology*, 42(8), 3865-3868.

[202]. Morgan, J., K. M. McCarthy, S. Gould, K. Fan, B. Athington-Skaggs, N. Iqhal, K. Stamey, R. A. Hajjeh, and M. E. Brandt, for the Gauteng Cryptococcal Surveillance Initiative Group. 2006. *Cryptococcus gattii* infection: characteristics and epidemiology in a South African province with high HIV seroprevalence, 2002–2004. *Clin. Infect. Dis.* 43:1077–1080.

[203]. West, S. K., & Byrnes, E. J. (2008, October). *rd*, Mostad S, et al.: Emergence of *Cryptococcus gattii* in the Pacific Northwest United States. In 48th Annual ICAAC/IDSA 46th Annual Meeting, Washington, DC (p. 658).

[204]. Chaturvedi, S., Dyavaiah, M., Larsen, R. A., & Chaturvedi, V. (2005). *Cryptococcus gattii* in AIDS patients, southern California. *Emerging infectious diseases*, 11(11), 1686.

[205]. Casadevall, A., & Perfect, J. R. (1998). *Cryptococcus neoformans* (Vol. 595). Washington, DC: ASM press.

[206]. Fu, C., Sun, S., Billmyre, R. B., Roach, K. C., & Heitman, J. (2015). Unisexual versus bisexual mating in *Cryptococcus neoformans*: consequences and biological impacts. *Fungal Genetics and Biology*, 78, 65-75.

[207]. ŞENGÜL, M., KUTLU, M., DÖĞEN, A., AKSOY, L., GONCA, S., İLKİT, M., & ERGİN, Ç. (2019). Denizli Bölgesinde Kestane (*Castanea sativa*) Ağacından *Cryptococcus neoformans* İzolasyonu. *Mikrobiyol Bul*, 53(1), 61-69.

[208]. ERGİN, Ç., ŞENGÜL, M., DÖĞEN, A., & İLKİT, M. (2019). Türkiye Geneline *Cryptococcus neoformans*' ın Tür Dağılımının Tahmini. *Mikrobiyol Bul*, 53(2), 233-238.

- [209]. Ergin, Ç., İlkit, M., Hilmioğlu, S., Kaleli, İ., Demirci, M., & Kaya, S. (2004). The first isolation of *Cryptococcus neoformans* from Eucalyptus trees in South Aegean and Mediterranean Regions of Anatolia in Turkey despite Taurus Mountains alkalinity. *Mycopathologia*, 158(1), 43-47.
- [210]. Ergin, Ç., İlkit, M., Hilmioğlu, S., Kaleli, İ., Demirci, M., & Kaya, S. (2004). The first isolation of *Cryptococcus neoformans* from Eucalyptus trees in South Aegean and Mediterranean Regions of Anatolia in Turkey despite Taurus Mountains alkalinity. *Mycopathologia*, 158(1), 43-47.
- [211]. Gökçen, H., & Ergin, Ç. Muğla Milas ilçe yerleşimi bölgesi Eucalyptus camaldulensis ağaçlarından *Cryptococcus neoformans* izolasyonu. *Pamukkale Tıp Dergisi*, (2).
- [212]. Cogliati, M., D'amicis, R., Zani, A., Montagna, M. T., Caggiano, G., De Giglio, O., ... & Ergin, C. (2016). Environmental distribution of *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* around the Mediterranean basin. *FEMS yeast research*, 16(4).



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Deniz AKTAŞ

Doğum Tarihi : 04.03.1994

E-mail : denizaktas_4@hotmail.com

Öğrenim Durumu :

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji	Mersin Üniversitesi	2013-2017

ESERLER

1. Kaplan, E., Aktaş, D., Önder, Ş., Metin, B., Döğen, A., Oz, Y., & Ilkit, M. (2019). Mating genotypes and susceptibility profiles of clinical isolates of *Candida glabrata* from Turkey. *Mycoses*.
2. AKTAŞ, D.; ŞEREFLİŞAN, H.; ALKAYA, A., BACTERIAL AND FUNGAL DISEASES OF AFFECTING COMMERCIAL CULTURED FROGS (*Pelophylax ridibundus*). 1. INTERNATIONAL CONFERENCE ON ENVIRONMENT, TECHNOLOGY AND MANAGEMENT (ICETEM), 2019-06-27, 2019-06-29, NİĞDE, Türkiye, 2019
3. AKTAŞ, D.; ŞEREFLİŞAN, H.; ALKAYA, A., Diseases in Land Snail Culture. 1. INTERNATIONAL CONFERENCE ON ENVIRONMENT, TECHNOLOGY AND MANAGEMENT, 2019-06-27, 2019-06-29, NİĞDE, Türkiye, 2019.