

综述

真菌细胞外囊泡的研究进展

袁鑫, 王俊瑞*

(内蒙古医科大学附属医院检验科, 呼和浩特 010000)

摘要: 细胞外囊泡(extracellular vesicle, EV)主要是由真核细胞、原核细胞分泌到体外的纳米颗粒, 其多被脂质双层结构所包裹, 所含成分包含蛋白质、脂质、核酸等多种生物活性分子。细胞外囊泡可在细胞间进行物质和信息传递, 并通过其所含多种活性成分发挥多种生物学功能。近年来研究发现, 多种真菌分泌的EV可参与真菌致病、耐药及免疫调控等过程, 是介导真菌多种生物学活性的重要载体之一。本文主要对真菌EV的化学组成、生物学功能、实验室检测技术及最新研究进展进行综述和分析, 为进一步深入探究其分子机制和更好地了解其潜在应用价值提供新的思路。

关键词: 真菌; 细胞外囊泡; 纳米颗粒

Research progress on extracellular vesicles of fungi

YUAN Xin, WANG Junrui*

(Department of Laboratory, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010000, China)

Abstract: Extracellular vesicles are nanoscale particles secreted by eukaryotic and prokaryotic cells to the outside of the body, which are abundant in proteins, nucleic acids and other biologically active molecules wrapped in a lipid bilayer. EVs can act as carriers to transfer bioactive materials and biological signals among different cells, and the bioactive materials wrapped in the EVs can exert multiple biological functions. Recently, it is extensively reported that EVs secreted by multiple fungi species acts as a kind of important vector in mediating multiple biological processes of fungi, including pathogenicity, antimicrobial resistance and immunal modulation. In this review, the chemical composition, biological functions, laboratory detection techniques and recent development of research in fungal EV will be summarized and analyzed, and the objective of this review is to provide new ideas for deep exploration of molecular mechanisms of fungal EV and better understanding its potential application values.

Key Words: fungus; extracellular vesicle; nanoparticles

细胞外囊泡(extracellular vesicle, EV)是由多种类型细胞分泌、呈双层脂质样结构、化学组成复杂的纳米级颗粒, 包含多种细胞来源成分(蛋白质、核酸、脂质等), 在介导细胞病理生理功能、免疫调控等方面发挥重要作用^[1]。有研究发现, 几乎所有类型细胞在生理或者病理状态下均可分泌

EV, 相关研究主要集中在人体细胞^[2], 而近年来关于微生物细胞外囊泡的报道呈明显增加趋势, 特别是针对细菌细胞外囊泡的相关研究^[3], 但关于真菌细胞外囊泡的报道较少。随着侵袭性真菌感染发病率及耐药株检出率的不断增加, 真菌致病及耐药机制受到更多关注^[4], 真菌EV在此过程中

收稿日期: 2023-12-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(81660352)

第一作者: E-mail: 1124303346@qq.com

*通信作者: E-mail: wangjunrui123@yeah.net

如何发挥作用值得进一步探究。

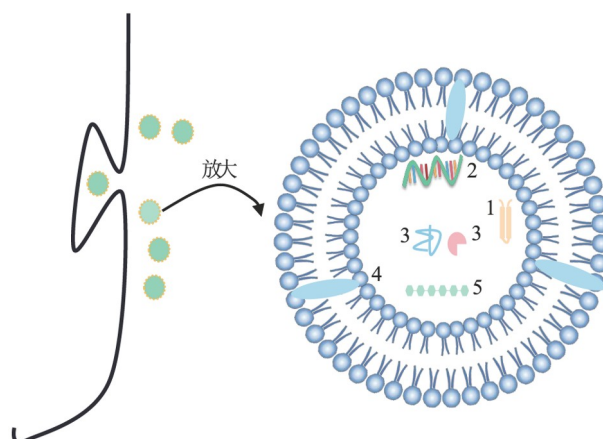
本文将针对真菌EV化学组成、形成机制、生物学功能等方面进行综述,以更好了解真菌EV在介导感染、免疫调控中的作用及与宿主细胞间相互作用的机制,为进一步探究其临床应用价值提供思路。

1 真菌EV生物学特性

细胞外囊泡是原核细胞和真核细胞在正常和病理生理状态下释放的膜状圆形小泡,根据其粒径大小和形成机制分为外泌体、微囊泡和凋亡小体三类^[5]。外泌体经内吞途径形成,粒径大小为30~100 nm;微囊泡由细胞膜向外出芽生成,粒径大小为100~1 000 nm;凋亡小体则通过程序性细胞死亡方式形成,粒径大小为800~1 000 nm^[6]。这些纳米级囊泡被脂质双层包裹,包含多种成分,如蛋白质、脂质、核酸(如mRNA和非编码RNA)、多糖、毒素、过敏原和色素等^[7]。目前针对真菌EV的研究结果显示,真菌EV通常具有以下功能。(1)细胞间通讯:EVs脂质双层可使其内所含活性成分(如RNA)在细胞外环境中不被降解,从而保护其“安全”地输送到靶细胞^[8],这种细胞间通讯可能会影响多种基因的表达调控,进而影响真菌毒力^[9]。(2)免疫调节:EV所含某些蛋白质成分可作为免疫原引发宿主免疫应答和炎症反应。(3)参与细胞壁形成:某些丝状真菌(如烟曲霉菌)EV被发现参与真菌细胞壁的重塑过程。EV蛋白质组学研究结果显示,EV参与细胞壁重要成分(如几丁质、葡聚糖或甘露聚糖残基)的生物合成和代谢^[6]。此外,生长条件可显著影响真菌EV的化学组成,不同培养基所得真菌EV,其内容物(如蛋白质、脂质)组成会发生相应改变^[9]。

2 真菌EV化学组成及生物学活性

真菌细胞外囊泡化学组成成分丰富,含核酸、蛋白质、脂质以及碳水化合物等多种物质(图1)。这些物质被证实可参与真菌致病、耐药及免疫调控等过程,介导真菌多种生物学活性。以下将对核酸、蛋白质、碳水化合物以及脂质这四种化学成分特点及功能进行逐一介绍。



1: 阮蛋白。与退行性疾病有关(如阿尔茨海默病)。2: RNA。(1)干扰宿主生理功能;(2)调节碳水化合物和次级代谢产物的生成;(3)调节毒力基因。3: 酶与蛋白质。(1)具有免疫原性;(2)与代谢有关;(3)参与细胞壁合成;(4)具有毒力作用。4: 脂质。与耐药性相关。5: 碳水化合物。(1)免疫调节;(2)介导毒力

图1 真菌细胞外囊泡结构组成

2.1 核酸

据报道,不同来源的EV均含有RNA^[10],真菌EV中同样存在RNA成分,其中大多数RNA分子都是小RNA,包括核仁小RNA(snoRNAs)、小核RNA(snRNAs)和tRNA片段(tfRNAs)^[11]。真菌EV中也存在一些调节性小RNA,如合轴马拉色菌EV中含有16~22 nt且类似于微小核糖核酸(miRNA)的小RNA^[12]。发酵毕赤酵母EV中存在微小核糖核酸(miRNA)样分子,与其从酵母样到假菌丝形态的转变有关^[13]。在荚膜组织胞质菌EV中发现,5 nt的反义RNA可能会在RNA干扰机制中发挥作用^[14]。此外,一些研究发现,EV-RNA组成与真菌细胞RNA组成不同,如rRNA占真菌细胞RNA的90%以上,而在真菌EV中几乎检测不到^[14,15]。为了对真菌EV中的RNA进行进一步研究,Peres da Silva等^[11]对几种不同真菌EV中的RNA成分进行分析后发现,新生隐球菌的EV样本中富含与细胞应激反应和转录调控有关的mRNA;巴西副球菌的EV样本中富含与细胞应激反应和细胞周期控制有关的mRNA;酿酒酵母的EV样本中富含与转录调控和细胞周期控制有关的mRNA。这些观察结果表明,真菌细胞利用EV输出具有不同生物学功能和不同性质的RNA分子,可能会影响细胞某些生理功能。同时,Silva等^[11]发现,真菌EV携带不同物种共有的mRNAs,但也可携带1~2个该物种所特有的RNA分子。另有研究发现,可引起毛霉菌病的真菌,其

EV中携带的RNA在碳水化合物代谢和次级代谢产物的生物合成中发挥作用,部分种属真菌的次级代谢产物与毒力密切相关^[16]。巴西副球菌EV内含有的sRNA序列编码真菌蛋白(如与毒力因子合成相关的 α -淀粉酶和参与细胞壁裂解的 β -葡聚糖酶),具有调控毒力基因表达的作用^[15]。

2.2 蛋白质

Gil-Bona等^[17]通过聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)技术分析来自不同真菌EV中的蛋白质含量,然后对其进行蛋白质染色、免疫印迹、蛋白质组学分析。通过对三种以上的真菌(如荚膜组织胞质菌、新生隐球菌、酿酒酵母)EV蛋白进行分析后发现,这些真菌EV中存在转运蛋白及与细胞代谢、应激反应、氧化还原、信号传导相关的蛋白质成分。同时,此研究根据白念珠菌EV蛋白参与的细胞生物学活性调控过程将其分成9个功能组,鉴定出75种蛋白质。在白念珠菌EV中未发现核糖体、细胞骨架和核蛋白,但检测到了黏附素和水解酶。目前确定的一些EV蛋白功能包括以下几个方面。(1)免疫原性。Rodrigues等^[18]通过SDS-PAGE技术分离新生隐球菌EV蛋白,采用免疫印迹法分析其与人类血清的反应性。隐球菌病患者血清与EV样本共孵育时,可检测到7条主要条带。该结果表明, EV中存在着有效的免疫原性成分。(2)参与细胞壁形成。Gonçalves等^[6]研究发现,烟曲霉原生质体在细胞壁再生条件下具有丰富的EV蛋白质成分,含有与细胞壁合成相关的酶,如葡聚糖合酶或几丁质合成酶。此外, EV不仅含有参与半乳糖氨基半乳聚糖(galactosaminogalactan, GAG)合成相关代谢酶(GAG是烟曲霉细胞外基质的关键成分),还含有GAG及其合成所需的单糖。(3)介导毒力。Rodrigues等^[18]发现,新生隐球菌EV中存在与黑色素合成有关的漆酶。Lavrín等^[19]对皮炎外瓶霉(*Exophila dermatitidis*)研究后发现,与不含黑色素的EV相比,携带黑色素的EV对神经母细胞瘤细胞的毒性作用更强,表明黑色素是介导细胞毒性的重要成分。此外,遗传因素也可影响真菌EV中的蛋白质组成及含量^[20]。

2.3 碳水化合物

目前,关于EV中碳水化合物含量的研究较

少,部分原因是糖组学分析需要相对大量的EV^[16]。新生隐球菌EV中含有葡萄糖醛酸甘露聚糖(glucuronoxylomannan, GXM),该物质可拮抗免疫细胞的吞噬作用,并且与真菌毒力相关^[7]。荚膜组织胞质菌EV中存在与毒力相关的大分子物质,如糖脂麦角甾基葡萄糖苷^[16]。荚膜组织胞质菌EV中也可检测到海藻糖,海藻糖是一种碳水化合物,在一定条件下与真菌生长和耐热性相关^[16]。另有研究发现,烟曲霉EV中存在多糖成分,如葡聚糖、半乳甘露聚糖和GAG^[21]。GAG是一种细胞壁多糖,有助于烟曲霉菌感染人体并在宿主和病原体相互作用过程中发挥重要作用,这也进一步证明了真菌EV具有免疫调节作用^[16]。

2.4 脂质

目前,关于真菌EV脂质的文献报道甚少。在技术层面,与EV碳水化合物分析类似,需要收集大量的EV才能进行脂质组学分析。此外, EV中脂质成分的丰度相对较低^[22]。白念珠菌EV中含有甾醇,其在很大程度上决定了白念珠菌对外界压力的敏感性,是抗真菌药物的重要靶标^[23]。Honorato等^[24]发现,白念珠菌EV中所含的脂质成分能够抑制其从酵母状向菌丝状转变,从而降低菌株毒力。荚膜组织胞质菌和巴西副球菌的EV主要含有甾醇和磷脂,如磷脂酰乙醇胺、磷脂酰胆碱和磷脂酰丝氨酸,它们是真菌脂质双层形成的关键元素^[25]。对巴西副球菌EV的脂质组学分析结果显示,其含量最多的脂质成分是芸苔甾醇^[26],芸苔甾醇与唑类抗真菌药物的耐药性有关^[27],表明EV与真菌耐药之间存在一定关联^[16]。另外,真菌EV与其来源的真菌脂质组成也有所不同。Zamith-Miranda等^[28]对白念珠菌和耳念珠菌及它们分泌EV的脂质组学分析结果显示,两种真菌EV中己糖基神经酰胺的含量分别是真菌细胞的67倍和109倍。

3 真菌EV分离纯化技术

目前,大多数研究都是从液体培养基中分离囊泡。Reis等^[29]开发了一种真菌EV快速制备方法,可以从固体培养基中分离EV。真菌在YPD固体培养基中培养后,用接种环从平板上收集真菌细胞,然后通过离心方法分步去除细胞和细胞碎片,再应用PBS缓冲液悬浮胞外囊泡和污染蛋白,

最终通过超速离心方法获得EV^[30](图2)。该方法可重复性较好,适用于多种真菌物种^[31]。此外,对分离的EV可进行两种不同类型的分析,分别是物理分析和化学分析^[32]。物理分析包括以下几种:(1)电子显微镜。通常用于可视化EV及其空间分布和形状^[33,34],评估其形态的两种常见电子显微镜是透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)和扫描电子显微镜(scanning electronic microscopy, SEM)。SEM和TEM可以生成高分辨率图像。两者的区别在于检测到了哪些电子——SEM检测散射电子,而TEM检测通过样品的电子^[32]。但是有学者指出,高分辨率的技术优势很容易被测量条件和样品制备流程的缺陷所抵消。透射电镜分析的样品在测量前必须进行固定和脱水。此外,图像采集必须在真空条件下进行^[8]。(2)纳米颗粒跟踪分析(nanoparticle tracking analysis, NTA)。此方法可以对样本中的EV进行量化检测,并获得其在群体中的分布特征^[34,35]。NTA系统在检测不同EV时有以下优势。首先,该技术可精确测量直径低至30 nm的小颗粒,而且样品采集在液相中进行,确保所分析的EV不发生变化;此外,样品制备流程非常快速和简单,测量过程只需几分钟;

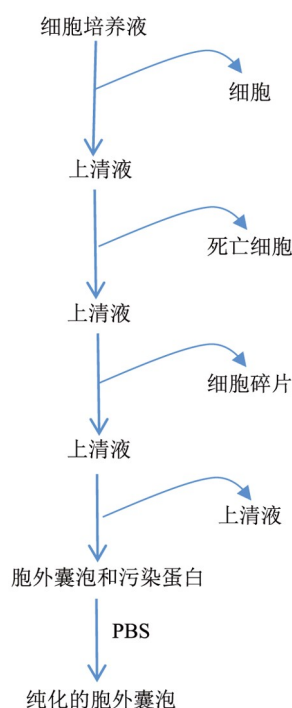


图2 真菌细胞外囊泡分离步骤

在测量完成后,样品可恢复为原始状态,使该技术更具吸引力^[8]。然而,NTA面临的挑战是,它需要约0.5 mL的样本量,并且数据收集和分析参数需要进行优化处理^[32]。另外,有研究指出,NTA系统能够检测荧光;但在实际应用中,荧光信号必须非常明亮才可检测出来^[36,37]。(3)动态光散射(dynamic light scattering, DLS)。与NTA一样,DLS应用粒子布朗运动引起的散射光来估测粒子大小和浓度。但DLS技术未采用散射光来确定粒子的扩散系数,而是使用散射光强度的变化来估计粒子的大小。与NTA不同之处在于,DLS只需要很少的样本体积。虽然DLS与NTA有各自技术优点,但DLS的主要不足之处是不利于分析非均质混合物。具体而言,散射光强度与颗粒直径的六次方成正比,较小颗粒产生的散射光更难于检测,因此,当悬浮液中存在颗粒大小不同的混合物时,通常会偏向于检出较大尺寸颗粒所产生的数据^[32]。

化学分析方法可以提供有关EV含量的信息^[32],常用的方法有如下几种。(1)流式细胞术。在过去二十年中,流式细胞术被认为是EV分析中最常用的技术之一,能够确定单个EV的细胞起源。尽管这种方法在检测小型EV方面存在局限,但其能够在一个样本中分析数千个EV,同时确定多个标记物^[8]。如果EV表面带有某些抗原,则可以通过荧光色素标记单克隆抗体进行检测。因此,可以根据抗原表达水平对所研究的囊泡群进行量化或分类^[38]。(2) Western blot。Western blot是当前最常用的外泌体分析方法之一,因为其易于使用、可获得性广,并且能够检测外泌体表面蛋白质和内部蛋白质。然而,该方法的主要缺陷是其特异性和重复性受到所用抗体质量的限制^[32]。(3)靶向蛋白质组学方法。最常见的方法是多重反应监测技术(multiple reaction monitoring, MRM)^[32]。由于MRM方法具有更低的检测限、更大的动态范围和更高的特异性,它是快速识别和量化样本中目标蛋白质的首选方法^[39]。在EV领域,特别是对于外泌体而言,MRM方法表征外泌体将会有利于后续研究,因为它比传统Western blot更具有检测通量和特异性方面的技术优势^[32]。

4 真菌EV生物学功能

4.1 参与致病过程

目前有研究发现,真菌EV成分参与真菌致病过程^[40]。Rodrigues等^[18]在新生隐球菌EV中鉴定出76种蛋白质,其中包括一些与毒力和抗氧化应激相关的蛋白质成分。此外,隐球菌病患者的血清可识别不同的EV蛋白成分^[18]。新生隐球菌EV可加强真菌穿透感染宿主血脑屏障的能力,并提高隐球菌在被感染小鼠大脑中的定植效果^[41]。马拉色拉菌是一种与人类皮肤疾病如特应性湿疹有关的真菌,其释放的EV是一些小RNA和过敏原成分的载体;这些成分可诱导炎性细胞因子反应并与宿主皮肤细胞相互作用,在致敏和炎症维持中发挥作用^[42]。另有研究显示,酿酒酵母EV可介导朊病毒转运^[43]。错误折叠的蛋白质组件与许多退行性疾病(如阿尔茨海默病)有关,这些错误折叠的蛋白质通过朊病毒样机制进行传播,EV则被认为是潜在的传播载体^[43]。与人类真菌病原体相比,人类对植物真菌病原体EV功能的了解更少^[16]。Costa等^[44]发现,指状青霉中的色氨酸对柑橘类植物具有毒性,其对柑橘类种子发芽具有显著抑制作用;指状青霉在感染植物的过程中会释放EV,色氨酸通过EV递送至植物体内引起植物损伤。植物病原体尖孢镰刀菌EV中富含两种类型的聚酮合酶,它们可能参与色素比卡菌素(bikaverin)的生物合成。EV和这种色素与棉花子叶过敏反应有关^[45]。聚酮合酶广泛参与植物病原体的毒素生成,在毒力方面发挥重要作用^[16]。

4.2 免疫诱导效应

EV在真菌与宿主相互作用中发挥重要作用,EV内含多种免疫原性分子,部分成分可诱导免疫反应,并可成为过敏原^[9]。念珠菌EV可刺激免疫细胞,导致一氧化氮产生和白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)、白细胞介素-12(interleukin-12, IL-12)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)分泌增加,以及树突状细胞中组织相容性复合体Ⅱ类(major histocompatibility complex-Ⅱ, MHC-Ⅱ)的表达增加^[46]。白念珠菌EVs中携带的高亲和力葡萄糖转运蛋白-1(high

affinity glucose transporter 1, Hgt1p)可以作为补体因子H(complement factor H, FH)结合分子,模仿人类细胞,从而逃避免疫反应,导致病原体毒力增加^[47]。荚膜组织胞质菌EV可抑制巨噬细胞的吞噬功能以及固有免疫细胞对真菌细胞的杀伤性,从而利于真菌细胞的存活和对宿主的持续感染^[48]。宿主亦可以通过免疫系统调节真菌EV的功能和致病性。Baltazar等^[49]分离出与单克隆抗体结合后的荚膜组织胞质菌EV,与未被单克隆抗体处理过的EV相比,EV的大小、蛋白质含量和一些与毒力相关的酶活性都有变化,如漆酶、过氧化氢酶和磷酸酶的活性降低,进而降低病原体的毒力。目前,细菌EV已被评估作为脑膜炎奈瑟菌疫苗制备的佐剂,真菌EV也可用于生产各种疫苗(如针对某些真菌病的疫苗)^[9]。然而,目前由于技术限制,对于真菌EV的研究仍不透彻,能否在体外实现大规模生产尚不明确。

4.3 介导耐药性

真菌EV不仅可作为细胞间物质传递的载体,也会影响真菌的耐药性。如白念珠菌是人类最常见的真菌病原体,通常以生物膜(biofilm)形式生长,导致慢性复发性感染^[50]。Taff等^[51]和Nett等^[52]发现,白念珠菌生物膜耐药的原因之一是细胞外基质中存在甘露聚糖-葡聚糖复合物;此外,白念珠菌EV可促进甘露聚糖-葡聚糖复合物的合成从而导致其耐药性^[50]。Zhao等^[53]通过实验提出假说来解释由EV介导的真菌耐药机制——EV充当诱饵,与抗真菌药物相互作用,阻止或减弱其对真菌细胞的杀伤作用。这种假说的提出也为日后研发新型抗真菌药物奠定了一定的理论基础。

5 真菌EV应用现状及前景

目前,对真菌EV的临床应用研究包括药物研发以及以真菌为基础的免疫治疗。Zarnowski等^[50]研究发现,内体蛋白分选转运复合体(endosomal sorting complex required for transport, ESCRT)是白念珠菌生物膜释放EV所必需的成分,他们的实验结果显示,21株白念珠菌ESCRT缺陷突变体中有16株菌释放EV的量下降,细胞外基质多糖水平降低,且对抗真菌药物氟康唑的敏感性增加。添加野生型生物膜EV可恢复ESCRT突变体胞外基质产

生及增强菌株耐药性。此研究表明,白念珠菌生物膜EV在胞外基质生成和生物膜耐药中起着关键作用。另外,有研究发现,一种新的抗真菌候选药物turbimicin会影响EV对生物膜基质的物质递送,导致真菌生物膜基质的组装受损,降低真菌耐药性^[54]。Oliveira等^[55]从希木龙念珠菌获取到高浓度的EV,用其刺激小鼠巨噬细胞,发现EV可以触发巨噬细胞氧化反应,诱导胞内ROS产生且不会影响巨噬细胞的活力,从而达到杀菌作用。Souza等^[56]研究发现,经烟曲霉EV免疫小鼠后,烟曲霉感染小鼠的肺组织损伤程度降低;经两性霉素B治疗后,与对照组小鼠相比,EV处理组小鼠存活率提高了30%;说明烟曲霉EV可以提高两性霉素B的疗效。Garcia-Ceron等^[57]对禾谷镰刀菌EV进行代谢组学分析,发现EV中存在代谢产物——对异丙基苯甲醇和2,4-二羟基二苯甲酮。体外抑菌实验结果显示,对异丙基苯甲醇可显著抑制金黄色葡萄球菌生长,而2,4-二羟基二苯甲酮对白念珠菌和禾谷镰刀菌生长呈现显著的抑制活性。这些研究结果表明,真菌EV可以成为抗细菌和真菌感染药物研发的突破口。此外,Rizzo等^[58]从无荚膜新生隐球菌突变株中获取EV,用其免疫小鼠,之后再用新生隐球菌感染小鼠,发现其生存时间显著延长。Vargas等^[46,59]利用白念珠菌进行研究后也得出类似结论。与PBS处理后的蜡螟幼虫(*Galleria mellonella*, *G. mellonella*)相比,在白念珠菌感染之前,用甾醇含量分别为1 μm 和2 μm 的EV接种*G. mellonella*幼虫,使其存活率相应提高了20%和40%。用白念珠菌感染小鼠后同样发现,与没有被EV免疫的小鼠相比,事先经过EV预处理的小鼠,其体内真菌数量显著减少。这些实验结果充分证明了真菌EV作为疫苗开发候选物的前景。

6 展望

目前的研究已对部分病原性真菌EV的结构特征、形成过程及作用机制进行了初步探究,发现了一些具有重要价值的分子机制,如介导细胞间通讯、介导毒力及耐药、介导宿主免疫应答机制等。但与其他真核细胞及细菌EV研究相比,真菌EV研究仍处于探索阶段。真菌EV高效分离纯化技

术的优化、不同种属真菌活性成分的筛选和鉴定、作为药物递送载体的潜在价值等方面仍需更深入的研究,为更好地阐明致病真菌EV功能、分子机制及发挥其潜在应用价值提供理论依据和数据支持。

参考文献

- [1] Sabatke B, Rossi IV, Sana A, et al. Extracellular vesicles biogenesis and uptake concepts: a comprehensive guide to studying host-pathogen communication. *Mol Microbiol*, 2023, mmi.15168
- [2] Jeppesen DK, Zhang Q, Franklin JL, et al. Extracellular vesicles and nanoparticles: emerging complexities. *Trends Cell Biol*, 2023, 33(8): 667-681
- [3] Toyofuku M, Schild S, Kaparakis-Liaskos M, et al. Composition and functions of bacterial membrane vesicles. *Nat Rev Microbiol*, 2023, 21(7): 415-430
- [4] Lass-Flörl C, Steixner S. The changing epidemiology of fungal infections. *Mol Aspects Med*, 2023, 94: 101215
- [5] Margolis L, Sadovsky Y. The biology of extracellular vesicles: the known unknowns. *PLoS Biol*, 2019, 17(7): e3000363
- [6] Gonçalves T, Oliveira J, Fernandes C. Filamentous fungi extracellular vesicles. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2021, 432: 45-55
- [7] Bielska E, May RC. Extracellular vesicles of human pathogenic fungi. *Curr Opin Microbiol*, 2019, 52: 90-99
- [8] Szatanek R, Baj-Krzyworzeka M, Zimoch J, et al. The methods of choice for extracellular vesicles (EVs) characterization. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(6): 1153
- [9] Liebana-Jordan M, Brotons B, Falcon-Perez JM, et al. Extracellular vesicles in the fungi kingdom. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(13): 7221
- [10] Zhang X, Vos HR, Tao W, et al. Proteomic profiling of two distinct populations of extracellular vesicles isolated from human seminal plasma. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(21): 7957
- [11] Peres da Silva R, Puccia R, Rodrigues ML, et al. Extracellular vesicle-mediated export of fungal RNA. *Sci Rep*, 2015, 5(1): 7763
- [12] Rayner S, Bruhn S, Vallhov H, et al. Identification of small RNAs in extracellular vesicles from the commensal yeast *Malassezia sympodialis*. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 39742
- [13] Leone F, Bellani L, Muccifora S, et al. Analysis of extracellular vesicles produced in the biofilm by the dimorphic yeast *Pichia fermentans*. *J Cell Physiol*, 2018, 233(4): 2759-2767
- [14] Alves LR, Peres da Silva R, Sanchez DA, et al.

- Extracellular vesicle-mediated RNA release in *Histoplasma capsulatum*. *mSphere*, 2019, 4(2): e00176-19
- [15] Peres da Silva R, Martins ST, Rizzo J, et al. Golgi reassembly and stacking protein (GRASP) participates in vesicle-mediated RNA export in *Cryptococcus neoformans*. *Genes*, 2018, 9(8): 400
- [16] Garcia-Ceron D, Bleackley MR, Anderson MA. Fungal extracellular vesicles in pathophysiology. *Subcell Biochem*, 2021, 97: 151-177
- [17] Gil-Bona A, Llama-Palacios A, Parra CM, et al. Proteomics unravels extracellular vesicles as carriers of classical cytoplasmic proteins in *Candida albicans*. *J Proteome Res*, 2015, 14(1): 142-153
- [18] Rodrigues ML, Nakayasu ES, Oliveira DL, et al. Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryot Cell*, 2008, 7(1): 58-67
- [19] Lavrin T, Konte T, Kostanjšek R, et al. The neurotropic black yeast *exophiala dermatitidis* induces neurocytotoxicity in neuroblastoma cells and progressive cell death. *Cells*, 2020, 9(4): 963
- [20] Morales P, Mencher A, Tronchoni J, et al. Proteomic characterization of EVS in non-pathogenic yeast cells. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2021, 432: 161-170
- [21] Rizzo J, Rodrigues ML, Janbon G. Extracellular vesicles in fungi: past, present, and future perspectives. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10: 346
- [22] Bleackley MR, Dawson CS, Anderson MA. Fungal extracellular vesicles with a focus on proteomic analysis. *Proteomics*, 2019, 19(8): e1800232
- [23] Lv Q, Yan L, Jiang Y. The synthesis, regulation, and functions of sterols in *Candida albicans*: well-known but still lots to learn. *Virulence*, 2016, 7(6): 649-659
- [24] Honorato L, de Araujo JFD, Ellis CC, et al. Extracellular vesicles regulate biofilm formation and yeast-to-hypha differentiation in *Candida albicans*. *mBio*, 2022, 13(3): e0030122
- [25] Nenciarini S, Cavalieri D. Immunomodulatory potential of fungal extracellular vesicles: insights for therapeutic applications. *Biomolecules*, 2023, 13(10): 1487
- [26] Vallejo MC, Nakayasu ES, Longo LVG, et al. Lipidomic analysis of extracellular vesicles from the pathogenic phase of *Paracoccidioides brasiliensis*. *PLoS One*, 2012, 7(6): e39463
- [27] Camacho E, Niño-Vega GA. *Paracoccidioides* Spp.: virulence factors and immune-evasion strategies. *Mediators Inflamm*, 2017, 2017: 1-19
- [28] Zamith-Miranda D, Heyman HM, Couvillion SP, et al. Comparative molecular and immunoregulatory analysis of extracellular vesicles from *Candida albicans* and *Candida auris*. *mSystems*, 2021, 6(4): e0082221
- [29] Reis FCG, Borges BS, Jozefowicz LJ, et al. A novel protocol for the isolation of fungal extracellular vesicles reveals the participation of a putative scramblase in polysaccharide export and capsule construction in *Cryptococcus gattii*. *mSphere*, 2019, 4(2): e00080-19
- [30] Chen J, Li P, Zhang T, et al. Review on strategies and technologies for exosome isolation and purification. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, 9: 811971
- [31] Rodrigues ML, Nimrichter L. From fundamental biology to the search for innovation: the story of fungal extracellular vesicles. *Eur J Cell Biol*, 2022, 101(2): 151205
- [32] Doyle L, Wang M. Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis. *Cells*, 2019, 8(7): 727
- [33] Lankford KL, Arroyo EJ, Nazimek K, et al. Intravenously delivered mesenchymal stem cell-derived exosomes target M2-type macrophages in the injured spinal cord. *PLoS One*, 2018, 13(1): e0190358
- [34] Liangsupree T, Multia E, Riekkola ML. Modern isolation and separation techniques for extracellular vesicles. *J Chromatography A*, 2021, 1636: 461773
- [35] Ferreira PM, Bozbas E, Tannetta SD, et al. Mode of induction of platelet-derived extracellular vesicles is a critical determinant of their phenotype and function. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 18061
- [36] Dragovic RA, Collett GP, Hole P, et al. Isolation of syncytiotrophoblast microvesicles and exosomes and their characterisation by multicolour flow cytometry and fluorescence nanoparticle tracking analysis. *Methods*, 2015, 87: 64-74
- [37] Dragovic RA, Southcombe JH, Tannetta DS, et al. Multicolor flow cytometry and nanoparticle tracking analysis of extracellular vesicles in the plasma of normal pregnant and pre-eclamptic women. *Biol Reprod*, 2013, 89(6): 151
- [38] Orozco AF, Lewis DE. Flow cytometric analysis of circulating microparticles in plasma. *Cytometry Pt A*, 2010, 77A(6): 502-514
- [39] Schey KL, Luther JM, Rose KL. Proteomics characterization of exosome cargo. *Methods*, 2015, 87: 75-82
- [40] Freitas MS, Pessoni AM, Coelho C, et al. Interactions of extracellular vesicles from pathogenic fungi with innate leukocytes. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2021, 432: 89-120
- [41] Huang SH, Wu CH, Chang YC, et al. *Cryptococcus neoformans*-derived microvesicles enhance the pathogenesis of fungal brain infection. *PLoS One*, 2012, 7(11): e48570
- [42] Johansson HJ, Vallhov H, Holm T, et al. Extracellular nanovesicles released from the commensal yeast *Malas-*

- sezia sympodialis* are enriched in allergens and interact with cells in human skin. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 9182
- [43] Rajendran L, Bali J, Barr MM, et al. Emerging roles of extracellular vesicles in the nervous system. *J Neurosci*, 2014, 34(46): 15482-15489
- [44] Costa JH, Bazioli JM, Barbosa LD, et al. Phytotoxic tryptoquialanines produced *in vivo* by *Penicillium digitatum* are exported in extracellular vesicles. *mBio*, 2021, 12(1): e03393-20
- [45] Bleackley MR, Samuel M, Garcia-Ceron D, et al. Extracellular vesicles from the cotton pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* induce a phytotoxic response in plants. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 1610
- [46] Vargas G, Rocha JDB, Oliveira DL, et al. Compositional and immunobiological analyses of extracellular vesicles released by *Candida albicans*. *Cell Microbiol*, 2015, 17(3): 389-407
- [47] Kenno S, Speth C, Rambach G, et al. *Candida albicans* factor H binding molecule hgt1p-a low glucose-induced transmembrane protein is trafficked to the cell wall and impairs phagocytosis and killing by human neutrophils. *Front Microbiol*, 2018, 9: 3319
- [48] Baltazar LM, Zamith-Miranda D, Burnet MC, et al. Concentration-dependent protein loading of extracellular vesicles released by *Histoplasma capsulatum* after antibody treatment and its modulatory action upon macrophages. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 8065
- [49] Baltazar LM, Nakayasu ES, Sobreira TJP, et al. Antibody binding alters the characteristics and contents of extracellular vesicles released by *Histoplasma capsulatum*. *mSphere*, 2016, 1(2): e00085-15
- [50] Zarnowski R, Sanchez H, Covelli AS, et al. *Candida albicans* biofilm-induced vesicles confer drug resistance through matrix biogenesis. *PLoS Biol*, 2018, 16(10): e2006872
- [51] Taff HT, Nett JE, Zarnowski R, et al. A *candida biofilm*-induced pathway for matrix glucan delivery: implications for drug resistance. *PLoS Pathog*, 2012, 8(8): e1002848
- [52] Nett JE, Sanchez H, Cain MT, et al. Genetic basis of *Candida biofilm* resistance due to drug-sequestering matrix glucan. *J Infect Dis*, 2010, 202(1): 171-175
- [53] Zhao K, Bleackley M, Chisanga D, et al. Extracellular vesicles secreted by *Saccharomyces cerevisiae* are involved in cell wall remodelling. *Commun Biol*, 2019, 2(1): 305
- [54] Zhao M, Zhang F, Zarnowski R, et al. Turbinmicin inhibits *Candida biofilm* growth by disrupting fungal vesicle-mediated trafficking. *J Clin Invest*, 2021, 131(5): e145123
- [55] Oliveira BTM, Dourado TMH, Santos PWS, et al. Extracellular vesicles from *Candida haemulonii* var. *vulnera* modulate macrophage oxidative burst. *J Fungi (Basel)*, 2023, 9(5): 562
- [56] Souza JAM, Gurgel ILS, Malacco NLSO, et al. Pre-exposure with extracellular vesicles from *Aspergillus fumigatus* attenuates inflammatory response and enhances fungal clearance in a murine model pulmonary aspergillosis. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12: 898619
- [57] Garcia-Ceron D, Truong TT, Ratcliffe J, et al. Metabolomic analysis of extracellular vesicles from the cereal fungal pathogen *Fusarium graminearum*. *J Fungi (Basel)*, 2023, 9(5): 507
- [58] Rizzo J, Wong SSW, Gazi AD, et al. *Cryptococcus* extracellular vesicles properties and their use as vaccine platforms. *J Extracell Vesicle*, 2021, 10(10): e12129
- [59] Vargas G, Honorato L, Guimarães AJ, et al. Protective effect of fungal extracellular vesicles against murine candidiasis. *Cell Microbiol*, 2020, 22(10): e13238