

行政院國家科學委員會補助
大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* ***** ***** *
* 計畫 剖析經Cdc4親合力純化之Jhd2其基因在白色念珠菌扮 *
* : 演酵母菌轉換至菌絲之角色(Dissecting the role of *
* 名稱 JHD2 whose protein product is affini) *
* ***** ***** *

執行計畫學生： 許婉華
學生計畫編號： NSC 99-2815-C-040-013-B
研究期間： 99年07月01日至100年02月28日止，計8個月
指導教授： 謝家慶

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，1年後可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

中華民國 100年03月31日

**Dissecting the role of *JHD2* whose protein product is
affinity-purified with Cdc4 in yeast-to-filament transition of
*Candida albicans***

執行計畫學生：許婉華

學生計畫編號：NSC 99-2815-C-040-01-B

研究期間：95 年7 月1 日至96 年2 月底止，計8 個月

指導教授：謝家慶 副教授

Abstract

白色念珠菌 (*Candida albicans*)，是一種伺機性感染的真菌，正常情況下寄生於人體的黏膜組織，當宿主免疫力低下時便會大量繁殖伺機感染宿主，嚴重時甚至造成致命的念珠菌菌血症；而抗真菌藥物造成人體的傷害與抗藥性的產生更增加了防治念珠菌症的難度，加上其本身雙倍體生物特性、不具完整的有性生殖世代交替以及密碼子的特殊使用皆造成對白色念珠菌研究上或遺傳操作上的阻礙。

白色念珠菌之致病力目前被認為與其不同的生長型態有密切關係，可見了解不同型態生成之分子機制對防治其相關疾病而言相當重要。而過去文獻上對白色念珠菌的研究資料較不完整，所以對於此菌種的研究都是先以親緣關係相當接近並且擁有較完整資料庫的出芽酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 做為參考依據，從而推測基因在白色念珠菌之功能為何。

目前已知 *CDC4* 這個具高度保留性的基因在出芽酵母菌中為一泛素化蛋白質且為必要基因，但在白色念珠菌當中 (*CaCDC4*) 卻為非必要基因且扮演其菌絲型態的負調控者，先前實驗室已尋找出一些與 *CaCDC4* 有交互作用的相關性蛋白質(Tseng, Lai et al. 2010)，其中 *JHD2* 為出芽酵母菌 histone 的去甲基酶 (demethylase)，而此功能受另一泛素化蛋白質 *Not4* 所調控，所以想藉由本次研究，利用酵母菌雙雜合系統了解 *JHD2* 與 *CDC4* 在白色念珠菌中的交互作用是否亦為此種上下遊調控關係，並探討 *JHD2* 是否為白色念珠菌之必要基因，且運用營養缺乏品系和野生型品系為親本剔除 *CaJHD2*，並進一步以 *ACT1* promoter 持續性表現 *CaJhd2*，觀察 *CaJhd2* 與 *CaCDC4* 之交互作用會如何影響白色念珠菌不同的生長型態。

Introduction

白色念珠菌分類上屬於真菌界芽孢綱子囊菌屬，正常情況下與人類共生，存在於口腔、黏膜、陰道、消化道或是皮膚及其他臟器中，一旦宿主的免疫力低下(Bennett 2003)，或是必須長期服用廣效抗生素造成體內環境改變時，白色念珠菌便會伺機侵犯人體組織，引起念珠菌感染，而在各國醫院的統計中，白色念珠菌所造成之念珠菌菌血症 (candidemia)，皆有逐漸上升的現象(Beck-Sague and Jarvis 1993; Fridkin and Jarvis 1996; Cheng, Yang et al. 2005)。

由於白色念珠菌與人類同為雙倍體的真核生物，所以抗真菌藥物往往也會對人體細胞帶來傷害，因而增加了藥物開發的困難性，加上近年來抗真菌藥物之濫用，使得白色念珠菌的抗藥性日以劇增(Barchiesi, Schimizzi et al. 2000)。然而，近年來一些小胜肽片段的發展，能將藥物專一性的送入真菌細胞內，以增加治療的效率(Su, Li et al. 2007)。而在感染力方面，白色念珠菌的致病力已被證實與其多樣性的生長型態相關(Whiteway and Oberholzer 2004)。所以，若能對白色念珠菌不同型態生成之分子機制有更仔細的了解，將有助於人類對抗白色念珠菌所造成的相關疾病。

過去對於出芽酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的研究已有相當完整的了解，且由於其親緣關係與白色念珠菌非常接近，所以在對於白色念珠菌的研究中，多數基因的功能都會從出芽酵母菌之同源基因推行而來(Berman and Sudbery 2002)。

有趣的是，為了因應體內的基因缺失，白色念珠菌似乎發展出一套與出芽酵母菌不同的機制，實驗室先前所研究的基因 *CDC4*，為兩者的同源基因，*CDC4* 對出芽酵母菌而言是影響細胞週期之必要基因，但若白色念珠菌的兩條 *CDC4* 同時遭剔除，菌體則會形成菌絲型態(Shieh, White et al. 2005)，在這裡產生了一個相當有趣的想法：如果此基因對出芽酵母菌而言是如此重要的基因，白色念珠菌在面對此基因缺失時所表

現出的反應應該也相當重要，且與型態上的轉變應有一定的相關性與重要性，所以本計畫想針對其生長型態做仔細的了解。

有別於出芽酵母菌，白色念珠菌具有一些生物特性：雙倍體，缺乏完整的世代交替，密碼子的特殊使用(Santos and Tuite 1995)，也增加了研究上的困難度，所以，對於基因的調控以及其觀察還是必須直接以白色念珠菌為模式來進行探討(Berman and Sudbery 2002)。

實驗室先前運用親和性蛋白質純化法與質譜儀的分析，找到了一些與 *CaCdc4* 相關的蛋白質，本次研究先挑選其中一個可能性的 *CaCDC4* 相關性基因 *C. albicans* (*CaJHD2*)，探討 *CaJhd2* 與 *CaCdc4* 之間的交互作用對白色念珠菌之形態改變之影響。*Jhd2* 為一去甲基酶 (demethylase)，在低等真核生物或是人類身上都可以找到同源基因，*Jhd2* 在出芽酵母菌 histone 的修飾上扮演重要的角色，*S. cerevisiae* *Jhd2* (*ScJhd2*) 對 histone 去甲基化的能力是經由 *S. cerevisiae* *Not4* (*ScNot4*) 多次泛素化 (polyubiquitination) 來調控，此上下游的關係似乎與出芽酵母菌某些受質須接受 *S. cerevisiae* *Cdc4* (*ScCdc4*) 泛素化的調控，才能執行或停止其作用的機制非常相似。

從以上對此基因於出芽酵母菌中的了解，讓我想在這次研究裡探討幾個問題：

1. *CaJHD2* 是否為白色念珠菌之必要基因？

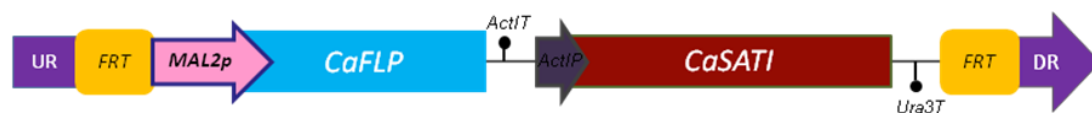
2. 失去 *CaJHD2* 是否對型態形成有影響？
3. *CaJhd2* 與 *CaCdc4* 是否有直接的交互作用？
4. *CaJhd2* 可否遏止在失去 *CaCdc4* 時的菌絲態的形成？
5. *CaJhd2* 的量是否受 *CaCdc4* 所降解？

Materials and Methods

計劃主要以 *SAT1*-flipper gene 剔除 *CaJHD2* 兩條等為基因方式，探討 *CaJHD2* 是否為白色念珠菌之必要基因；若 *CaJHD2* 為白色念珠菌之必要基因則無法以此法剔除 *CaJHD2*，則利用營養缺乏品系 BWP17 (*ura3Δ::limm434/ura3::limm43 arg4::hisG/arg4::hisG his1::hisG/his1::hisG*) 為親本建構 *CaJhd2* *-/-* 菌株，以下為此兩種方法之詳細步驟：

以 *SAT1*-flipper 剔除 *CaJHD2* 兩條等位基因

將 *CaJHD2* 的上下游片段接入 pSFS2A 載體中，pSFS2A 為一帶有 *SAT1*-flipper cassette 的質體(下圖)。此 cassette 的前後之相同序列稱為 *Flp* recombinase target (FRT)，能被 *Flp* recombinase 所辨識。分別利用 *KpnI*、*XhoI* 以及 *NotI*、*SacII* 切點將上下游 *CaJHD2* 片段分別接入 pSFS2A 載體上，此建構好的質體 pSFS2A-*CaJHD2*，以 *KpnI* 和 *SacII* 將 cassette 切下，利用電穿孔的方式送入野生型白色念珠菌 SC5314，經由 cassette 上的 *CaJHD2* 上下游片段和 SC5314 本身的 *CaJHD2* 進行同源互換，進而以



SAT-flipper cassette 將 *CaJHD2* 剔除；cassette 上的 *SAT1* 產物能幫助細胞對抗 nourseothricin (Nou.) 抗真菌藥物，讓成功插入 cassette 的菌株能存活於含有 Nou. 的培養基上；cassette 上另一個基因 *FLP* 的產物 *Flp* recombinase，則能辨識到 *FRT* 序列並將兩個 *FRT* 間的片段給剔除，留下一個 *FRT* 序列；*FLP* 位在可以人為調控，利用 maltose 進行誘導的 *MAL2* promoter 之下。以 3 c.c. 含有 2% maltose 取代 glucose 為碳源的培養液誘導，接著進行選殖：隨機挑選經誘導之菌株保存於 YPD 瓊膠培養基上，設計一組 primer 一個方向位於 cassette 上，另一方向位於 cassette 插入位置外側，colony PCR 初步確認後，再利用 100 µg/ml Nou. 確認抗真菌能力已失去，經由上述步驟已經得到一個等位基因 *CaJHD2* 遭剔除的菌株。後續將重複以上步驟剔除另一個等位基因 *CaJHD2*，觀察建構完成的 *CaJHD2*^{-/-} 菌株的生長型態。

以營養缺乏菌株為親本剔除一條 *CaJHD2* 等位基因，另一條則置於

MET3 promoter 下游調控

由於參考文獻得知，營養缺乏品系之建構常出現建構品系遭重新置入之營養代謝必要基因所影響，固本方法改為一條 *CaJHD2* 利用 *SAT1*-flipper gene 剔除，另一條置於 *MET3* promoter 下游調控，以期減少營養代謝基因所帶來的影響。建構 pSFS2A-*CaJHD2* 得到的 *SAT1*-Cassette 已置入營養缺乏品系 BWP17 中置換第一條 *CaJHD2*，

第二條取代 *CaJHD2* 之 pFA-HIS-MET3p-*CaJHD2* 之建構如下：*CaJHD2*

以 PCR 的方式放大會編碼只含 N-端 *CaJHD2* 的 DNA 片段選殖入

pFA-HIS1-Met3p 可得 pFA-HIS1- Met3p-*CaJHD2*。尋找並利用

pFA-HIS1-Metp-*CaJHD2* 中只編碼 N-端 *CaJHD2* DNA 的獨一無二的切點

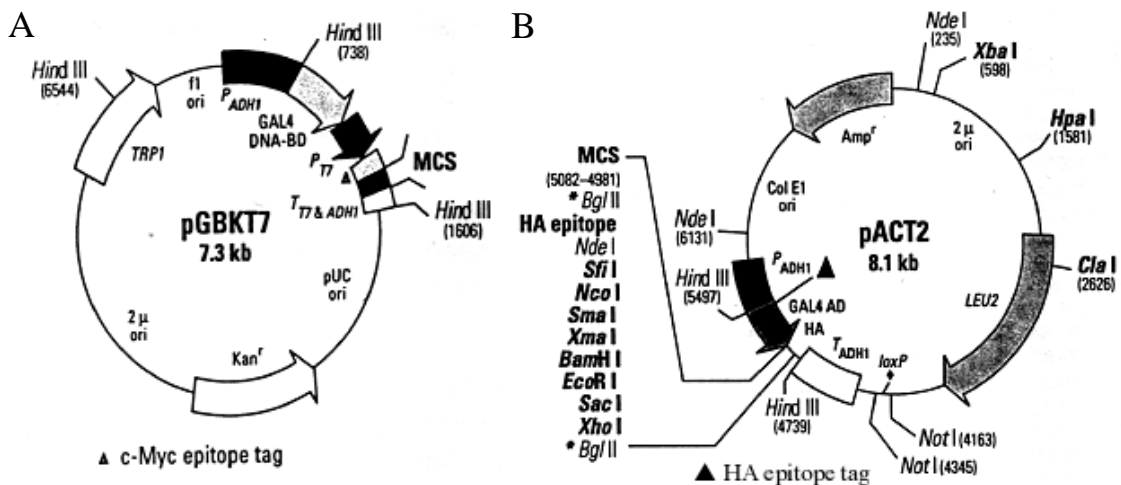
*Bst*BI 將此質體線性化；目前質體建構也已經完成並定序無誤，待送入

一條 *CaJHD2* 已遭剔除之 BWP17，透過 *HIS1* cassette 剔除的菌株，篩選

能於缺 histidine 培養基生長形成菌落之菌株，剔除另一條 *CaJHD2*。

酵母菌雙雜合系統(Yeast two hybrid)

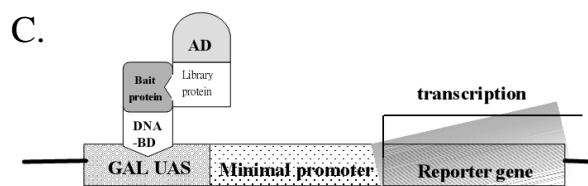
以選殖的方式將 *CaJHD2* 基因的蛋白質編碼區接入帶有抗 ampicillin 以及 *LEU* 篩選標記的 pACT2 中(下圖)，接著將 pACT2-*CaJHD2* 和實驗室的 pGBKT7-*CaCDC4* 質體分別送入 *MAT α*



出芽酵母菌 Y187(*leu⁻*) 和 *MAT α* 出芽酵母菌 AH109(*trp⁻*) 後，用

Yeast colony PCR 的方式進行初步確認；接著，將此兩種建構好的出芽

酵母菌株，於 30°C 環境下，培養 4.5 小時，讓 a type 與 α type 的菌株進行接合作用，然後以缺乏 leusine、trptophen 的酵母菌培養基選殖同時帶有 pACT2-CaJHD2 和 pGBKT7-CaCDC4 的菌株。pACT2 帶有能轉譯出 Gal4 DNA binding domain 的序列，Gal4 DNA binding domain 能結合到 GAL USA element，而 pGBKT7 則帶有能轉譯出 Gal4 activation domain 的序列，若 CaJhd2 和 CaCdc4 有交互作用，則可以讓 Gal4 activation domain 啟動下游的報導基因 *HIS3* (下圖)，菌株可以生長在缺乏 leusine、trptophen 和 histidin 的培養基(SC-leu-try-his)上，利



圖A.B.C.

酵母菌雙雜和系統所使用的質體與其原理。

用 *HIS3* 的表現與否得知 CaJhd2 和 CaCdc4 是否有直接的交互作用。

在 CaCDC4 人為調控表現下持續性表現 CaJhd2

本實驗需要質體 p6HF-ACT1-CaJHD2，此質體帶有能持續性表現 CaJhd2 之 ACT1 promoter，經質體轉譯出來的 CaJhd2 帶有 6xHIS 及 FLAG 兩種 epitope，以 *XhoI*、*SphI* 兩切點將 *CaJHD2* 接入 p6HF-ACT1，經定序確認轉譯區域及 epitope 序列無誤；後續將利用單一切點線性化此質體後送入 JSCA0022，利用質體上帶有的非必要基因 *CaRP10*，讓此片段的 *RP10* 與內源性 *RP10* 做同源互換將 *CaJHD2* 嵌

入於 JSCA0022 的基因體中，再來以含有 Met/Cys 的培養液誘導 *MET3* promoter 抑制 *CaCdc4* 的表現，做 Western blotting 以 anti-FLAG 偵測 *CaJhd2*。

Results and Discussion

針對了解 *CaJHD2* 是否為白色念珠菌之必要基因，以野生型白色念珠菌利用 *SAT1*-flipper gene 建立 *jhd2* 突變株為首選：建構 pSFS2A-*CaJHD2*，以 *KpnI*、*XhoI* 將 *CaJHD2* 上游接入 pSFS2A(Figure 1.)，得到 pSFS2A-*CaJHD2UR* 質體，再利用 *NotI*、*SacII* 將下游 *CaJHD2* 片段接入 pSFS2A-*CaJHD2UR* (Figure 1.) 載體，完成 pSFS2A-*CaJHD2* 質體之建構。利用 *KpnI*、*SacII* 將部分質體切下即得 *SAT1*-flipper cassette，接下來利用白色念珠菌電穿孔的方式將 cassette 轉殖入 SC5314，以含 Nou.(200 µg/ml) 的 YPD 培養基篩選第一條 *CaJHD2* 對偶基因遭 *SAT1*-flipper cassette 替換的菌株，設計一組引子：Forward 引子位於 *CaJHD2* 上游約 700 bp. 的位置，Reverse 引子位於 cassette 上之 *MAL2* promoter，以確認 cassette 是否如預期般取代 *CaJHD2* 之位置(Figure 2.)，利用 2% maltose 取代 glucose 為碳源的培養液誘導 cassette 剔除，無法存活於 Nou.(100 µg/ml) YPD 培養基之菌株表示其 cassette 成功剔除 (Figure 3.)，。目前經由上述步驟已得到一個等位基因 *CaJHD2* 遭剔除的菌株，但第二條 *CaJHD2* 仍無法成功剔除。

若無法以 *SAT1-flipper gene* 方法剔除 *CaJHD2* 是因為 *CaJHD2* 為白色念珠菌之必要基因，則改用 BWP17 為親本，建構以人為調控的 *jhd2* 突變株：第一條 *CaJHD2* 一樣利用 *SAT1-flipper cassette* 剔除 (Figure 4.)，另一條 *CaJHD2* 則利用 pFA-HIS-MET3p-*CaJHD2*(Figure 5a.)：質體上以 *SphI* 接入的 *CaJHD2* N 端約 340 鹼基對序列 (Figure 5b.) 做為同源互換區，質體建構完成後，利用 *BstBI* 將質體線性化後送入一條 *CaJHD2* 遭剔除的 BWP17，並以缺乏 histidine 之培養基選殖能存活之菌株。建構完成後，能以 Methionine/Cysteine(2.5mM) 人為抑制 *MET3* promoter 啟動下游 *CaJHD2* 的表現，菌株若無法存活則表示 *CaJHD2* 為白色念珠菌之必要基因。

利用酵母菌雙雜合系統 (Yeast two hybrid) 探討 *CaJhd2* 與 *CaCdc4* 間的交互作用是否為直接交互作用，以 *EcoRI*、*XhoI* 切點將 *CaJHD2* 基因蛋白質編碼區轉接於 pACT2 質體(Figure 6a.)。pACT2-*CaJHD2* 質體建構完成後(Figure 6b.)，以化學方法將質體送入 *MAT α* 出芽酵母菌 Y187(*leu*⁻)，與實驗室先前已建構完成帶有 pGBKT7-*CaCDC4* 之 *MAT α* 出芽酵母菌 AH109(*trp*⁻) 於 30°C 環境下進行接合作用，接合成功之菌株須帶有兩質體方能存活於缺乏 leucine、tryptophan 之環境 (SC-Leu-Trp)(Figure 7a.)。另外，若 *CaJhd2* 與 *CaCdc4* 間有直接交互作用則可以存活於缺乏 histidine 的環境中 (SC-Leu-Trp-His)，透過接合

成功之菌株無法於 SC-Leu-Trp-His 培養基形成菌落 (Figure 7b.)，得知 *CaJhd2* 與 *CaCdc4* 兩者之關連並非直接交互作用。

實驗室先前經由親和性蛋白質純化法與質譜儀的分析找到的結果，顯示 *CaJhd2* 在蛋白質層次的表現上與 *CaCdc4* 是功能相關蛋白質的關係，透過酵母菌雙雜合系統了解此關係並非直接交互作用。為了解此連結是建立在何種可能的關係，送入外源性的 *CaJHD2* 經 *ACT1* promoter 持續性表現 *CaJhd2*，並且表現在能人為調控 *CaCDC4* 表現的菌株—JSCA0022 中，透過對 *CaCDC4* 的人為調控了解 *CaCdc4* 的存在是否影響 *CaJhd2* 的表現量。目前 p6HF-ACT1-*CaJHD2* 質體的建構已完成 (Figure 8.)，但在後續多次送入 JSCA0022 中皆無法將此外源性質體插入其基因體，所以仍未能進一步探討 *CaCdc4* 與 *CaJhd2* 的關係。多次失敗結果可能的原因仍未清楚，若探究基因的問題點上，可能是增量表現 *CaJhd2* 之菌株無法存活，另外，使用此質體之文獻較少，而此質體經多次改造，可能存在未預期之改變，加上先前實驗室使用此質體亦有較曲折之經驗，故不排除無法得到此菌株的可能性。於是目前已著手進行利用 tet-on 系統在 JSCA0022 大量表現 *CaJhd2* 之建構，能藉由不同濃度之四環黴素操控 *CaJhd2* 之表現量，能排除因 *CaJhd2* 增量表現不利菌株存活的可能性，另一方面，tet-on 系統也有較大量的文獻使用，所得之結果可能更具可靠性。

近來已有文獻證實白色念珠菌 histone 甲基化修飾的不同，能影響其外表型的表現，*CaSet1* 於白色念珠菌中，為一甲基化轉移酶，會專一性辨識到 histone H3 lysine 4 的位置，進行三甲基化的修飾，剔除 histone 甲基轉移酶 *CaSet1* 之白色念珠菌能形成嵌入式菌絲型態的菌落，並改變了細胞表面之膜電位，影響其附著能力(Raman, Nguyen et al. 2006)。顯然白色念珠菌外表型和 histone 甲基化的機制具相關性。而 *Jhd2* 在出芽酵母菌中扮演去甲基酶的角色，因此推測其同源蛋白質 *CaJhd2* 可能為白色念珠菌 histone 的去甲基酶，*CaJhd2* 的功能或許與 *CaSet1* 為拮抗的關係。雖然對於白色念珠菌的品系建構較不容易，但仍想繼續對 *CaJHD2* 做基因及功能上的探討，以期對白色念珠菌型態轉換或是 histone 的甲基化修飾上有些微的了解。

Future work

若 *jhd2* null mutant (*jhd2* $-/-$) 建構完成；*jhd2* $+/-$ 、*jhd2* $-/-$ 菌株會以南方點墨法確認基因組是否被改造為預期的構造；另一方面也會完成在 BWP17 中利用 *MET3* 啟動子調控內源性 *CaJHD2*，以人為抑制 *CaJHD2* 的表現，藉此了解 *CaJHD2* 是否為必要基因，並因此無法以野生型白色念珠菌建構 *jhd2* $-/-$ 菌株；另外參考出芽酵母菌中 *Jhd2* 的功能，欲利用 tet-on 系統大量表現 *CaJhd2*，並測定各菌株 Histone H3K4 三甲基化的程度，藉此希望能了解 *CaJhd2* 在白色念珠菌中的功能。

Acknowledgements

在此感謝國家科學委員會資助本次計劃；以及謝家慶老師和實驗室中其他成員的協助與指導，雖然本次計劃仍未解答先前提出的問題，但透過本次計劃進行間老師及學長姐的用心指導，除了學習到實驗上的技術，我更學習到了研究設計的邏輯，與蒐集、整合、參考文獻資料的能力，對未來繼續在此領域學習和白色念珠菌相關知識絕對有相當大的幫助。

Figures :

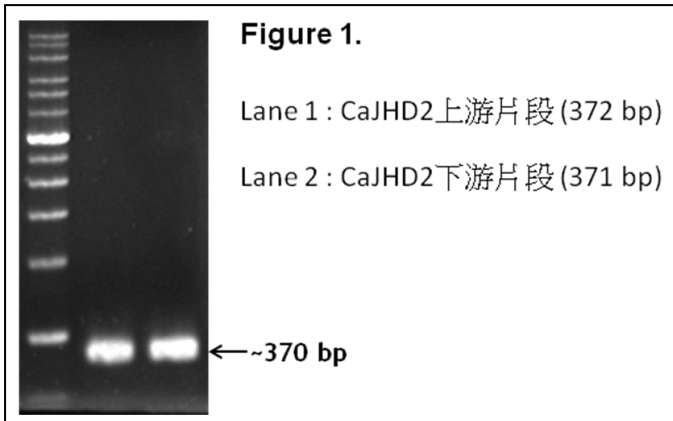


Figure 2.

a.
利用引子 (figure 2b.) 確認 *jhd2* 位置被 *SAT1*-flipper Cassette 所替換；並利用 Maltose 誘導 Cassette 的剔除。

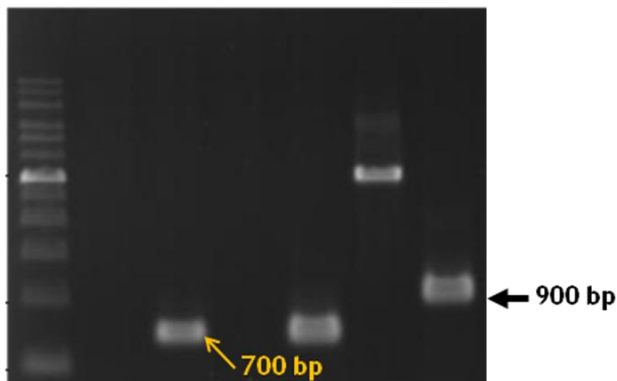
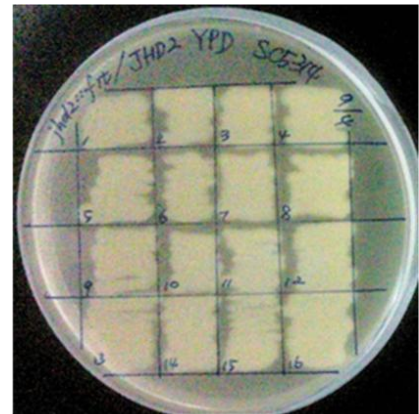
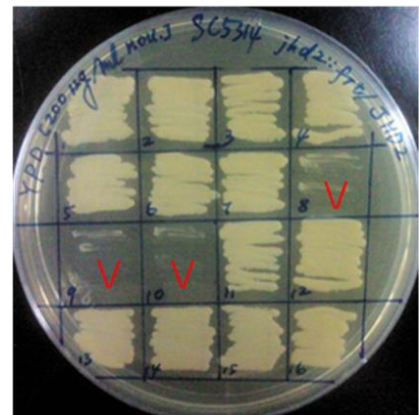


Figure 3.

選殖出來的菌株利用 100 $\mu\text{g/ml}$ YPD 培養基確認 cassette 已遭剔除



YPD



YPD [100 $\mu\text{g/ml}$ nou.]

b. 設計用以確認 *jhd2*-/S 之引子 (註：I.F 與 II.F 為同一條)

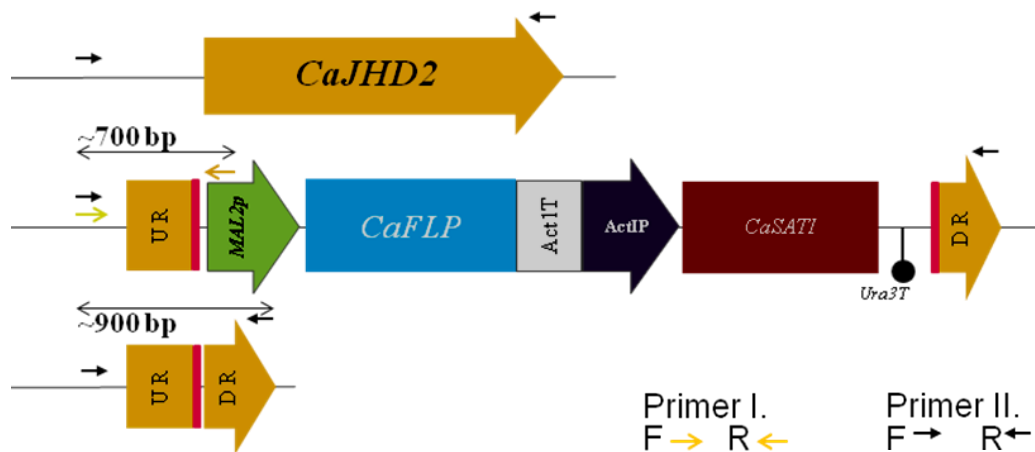


Figure 4.

SAT1-flipper cassette 取代 BWP17 之 *CaJhd2*，以 figure 2b.primers I. 確認 cassette 位置，片段大小正確。

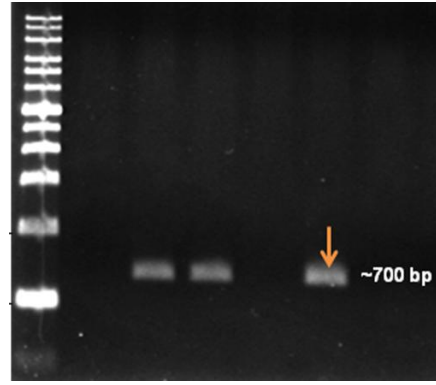
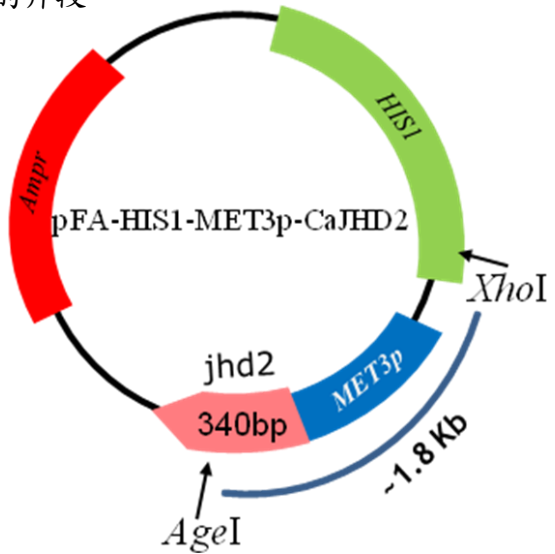
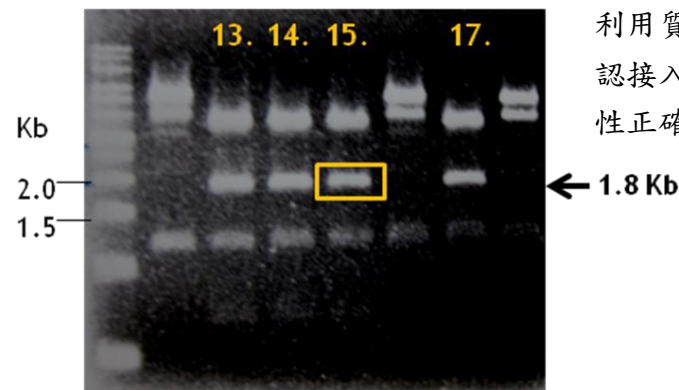


Figure 5.

a. 質體 pFA-HIS1-MET3p-CaJHD2：帶有單一切點 *AgeI*、*XhoI* 能將質體切下約 1.8 Kb 的片段。



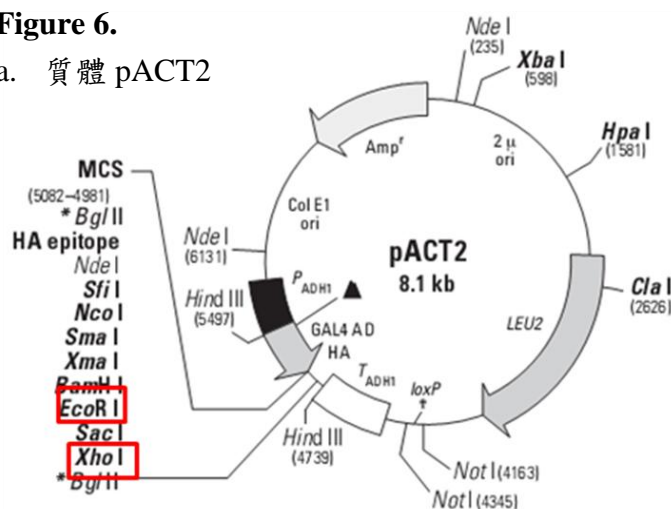
b.



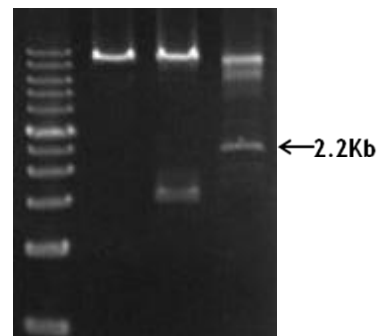
利用質體上兩個單一切點 *AgeI*、*XhoI* 確認接入的小片段 *CaJHD2* (340 bp) 之方向性正確。

Figure 6.

a. 質體 pACT2



b. 利用 *EcoRI*、*XhoI* 切點將 *CaJHD2*(2.2Kb) 接 pACT2，完成 pACT2-CaJHD2 質體建構。



References

- Atir-Lande, A., Gildor, T., and Kornitzer, D. (2005).** Role for the SCFCDC4 ubiquitin ligase in *Candida albicans* morphogenesis. *Mol Biol Cell* 16, 2772-2785.
- Bahman, M., Buck, V., White, A., and Rosamond, J. (1988).** Characterisation of the CDC7 gene product of *Saccharomyces cerevisiae* as a protein kinase needed for the initiation of mitotic DNA synthesis. *Biochim Biophys Acta* 951, 335-343.
- Barchiesi, F., Schimizzi, A.M., Caselli, F., Novelli, A., Fallani, S., Giannini, D., Arzeni, D., Di Cesare, S., Di Francesco, L.F., Fortuna, M., et al. (2000).** Interactions between triazoles and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 2435-2441.
- Beck-Sague, C., and Jarvis, W.R. (1993).** Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. National Nosocomial Infections Surveillance System. *J Infect Dis* 167, 1247-1251.
- Bennett, G. (2003).** Medical undergraduate teaching in chronic wound care (a survey). 1992. *J Tissue Viability* 13, 150-152.
- Berman, J., and Sudbery, P.E. (2002).** *Candida Albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat Rev Genet* 3, 918-930.
- Cheng, M.F., Yang, Y.L., Yao, T.J., Lin, C.Y., Liu, J.S., Tang, R.B., Yu, K.W., Fan, Y.H., Hsieh, K.S., Ho, M., et al. (2005).** Risk factors for fatal candidemia caused by *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species. *BMC Infect Dis* 5, 22.
- Fridkin, S.K., and Jarvis, W.R. (1996).** Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev* 9, 499-511.
- Ingvarsdottir, K., Edwards, C., Lee, M.G., Lee, J.S., Schultz, D.C.,
- Shilatifard, A., Shiekhattar, R., and Berger, S.L. (2007).** Histone H3 K4 demethylation during activation and attenuation of GAL1 transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 27, 7856-7864.
- Liang, G., Klose, R.J., Gardner, K.E., and Zhang, Y. (2007).** Yeast Jhd2p is a histone H3 Lys4 trimethyl demethylase. *Nat Struct Mol Biol* 14, 243-245.
- Lo, H.J., Kohler, J.R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A., and Fink, G.R. (1997).** Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* 90, 939-949.
- Mersman, D.P., Du, H.N., Fingerman, I.M., South, P.F., and Briggs, S.D. (2009).** Polyubiquitination of the demethylase Jhd2 controls histone

methylation and gene expression. *Genes Dev* 23, 951-962.

Patterson, M., Sclafani, R.A., Fangman, W.L., and Rosamond, J. (1986). Molecular characterization of cell cycle gene CDC7 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 6, 1590-1598.

Pickart, C.M., and Eddins, M.J. (2004). Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1695, 55-72.

Raman, S. B., M. H. Nguyen, et al. (2006). *Candida albicans* SET1 encodes a histone 3 lysine 4 methyltransferase that contributes to the pathogenesis of invasive candidiasis. *Mol Microbiol* 60(3): 697-709.

Reuss, O., Vik, A., Kolter, R., and Morschhauser, J. (2004). The SAT1 flipper, an optimized tool for gene disruption in *Candida albicans*. *Gene* 341, 119-127.

Santos, M.A., and Tuite, M.F. (1995). The CUG codon is decoded in vivo as serine and not leucine in *Candida albicans*. *Nucleic Acids Res* 23, 1481-1486.

Scaglione, K.M., Bansal, P.K., Deffenbaugh, A.E., Kiss, A., Moore, J.M., Korolev, S., Cocklin, R., Goebel, M., Kitagawa, K., and Skowyra, D.

(2007). SCF E3-mediated autoubiquitination negatively regulates activity of Cdc34 E2 but plays a nonessential role in the catalytic cycle in vitro and in vivo. *Mol Cell Biol* 27, 5860-5870.

Shieh, J.C., White, A., Cheng, Y.C., and Rosamond, J. (2005).

Identification and functional characterization of *Candida albicans* CDC4. *J Biomed Sci* 12, 913-924.

Su, Z., Li, H., Li, Y., and Ni, F. (2007). Inhibition of the pathogenically related morphologic transition in *Candida albicans* by disrupting Cdc42 binding to its effectors. *Chem Biol* 14, 1273-1282.

Trewick, S.C., McLaughlin, P.J., and Allshire, R.C. (2005). Methylation: lost in hydroxylation? *EMBO Rep* 6, 315-320.

Tseng, T. L., W. C. Lai, et al. (2010). Affinity purification of *Candida albicans* CaCdc4-associated proteins reveals the presence of novel proteins involved in morphogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 395(1): 152-157.

Tsukada, Y., Fang, J., Erdjument-Bromage, H., Warren, M.E., Borchers, C.H., Tempst, P., and Zhang, Y. (2006). Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* 439, 811-816.

Whiteway, M., and Oberholzer, U. (2004). *Candida* morphogenesis and host-pathogen interactions. *Curr Opin Microbiol* 7, 350-357.

Willems, A.R., Schwab, M., and Tyers, M. (2004). A hitchhiker's guide to the cullin ubiquitin ligases: SCF and its kin. *Biochim Biophys Acta* 1695, 133-170.