

doi: 10.3969/j.issn.1674-1242.2023.03.009

组蛋白甲基转移酶 SETD2 在肾细胞癌 发生中的作用机制

刘长伟, 李晓雪, 饶汉钰, 冯文心, 张伟, 马春晓, 徐悦, 李力
(上海交通大学生物医学工程学 Med-X 研究院, 上海 200030)

【摘要】肾细胞癌是一种具有复杂遗传背景的癌症, 研究表明, 异常的表观遗传调控是肾细胞癌发生的主要原因之一。组蛋白甲基转移酶 SETD2 是一种重要的表观遗传分子, 并且在肾细胞癌中具有很高的突变率。为了探究 SETD2 在肾细胞癌发生与发展中的作用和机制, 该研究利用肾脏特异性敲除 SETD2 的基因小鼠模型与肾细胞癌表型分析, 发现在 VHL 缺失的条件下, SETD2 的缺失能够导致肾细胞癌的发生。转录组测序结果显示, SETD2 的敲除导致了 Wnt/ β -catenin 与 FoxO 信号通路的激活。该研究为肾细胞癌的治疗提供了新的靶点和思路。

【关键词】组蛋白甲基转移酶; 转录组测序; SETD2; 肾细胞癌

【中图分类号】Q756, R361+.2, R318.04 **【文献标志码】**A 文章编号: 1674-1242 (2023) 03-0277-08

Mechanism of Histone Methyltransferase SETD2 in Renal Cell Carcinogenesis

LIU Changwei, LI Xiaoxue, RAO Hanyu, FENG Wenxin, ZHANG Wei, MA Chunxiao, XU Yue, LI Li
(Med-X Research Institute, Shanghai Jiao Tong University School of Biomedical Engineering, Shanghai 200030, China)

【Abstract】Renal cell carcinoma is a cancer with a complex genetic background, and studies have shown that aberrant epigenetic regulation is one of the major causes of renal cell carcinogenesis. Histone methyltransferase SETD2 is an important epigenetic molecule and has a high mutation rate in renal cell carcinoma. To investigate the role and mechanism of SETD2 in the development of renal cell carcinoma, this study used a mouse model of kidney-specific knockout of SETD2 with renal cell carcinoma phenotype analysis, and found that deletion of SETD2 in VHL-deficient conditions could lead to renal cell carcinoma development. According to the transcriptome sequencing results, SETD2 knockdown led to the activation of Wnt/ β -catenin and FoxO signaling pathways. This study provides new therapeutic targets and therapeutic ideas for the treatment of renal cell carcinoma.

【Key words】Histone Methyltransferase; Transcriptome Sequencing; SETD2; Renal Cell Carcinoma

收稿日期: 2023-06-01

基金项目: 国家自然科学基金 (82073104) 资助项目。

作者简介: 刘长伟 (1997—), 男, 山东省淄博市人, 硕士研究生, 从事表观遗传与疾病的发生发展研究。

通信作者: 李力, 男, 研究员, 博士生导师, 电话 (Tel.): 86-021-62933629, E-mail: lil@sjtu.edu.cn。

0 引言

肾细胞癌 (Renal Cell Carcinoma, RCC) 是男性第六最常诊断、女性第十最常诊断的癌症, 分别占所有肿瘤诊断的 5% 和 3%^[1]。肾细胞癌发源于肾小管上皮细胞, 是泌尿系统最常见的恶性肿瘤之一。肾细胞癌的发病率一直在上升, 有相当一部分患者被诊断为局部晚期疾病, 并且有高达 17% 的患者在诊断时有远处转移^[2]。肾细胞癌占肾癌总发病率的 95% 以上, 主要存在 3 种组织学亚型, 分别是透明细胞肾细胞癌 (Clear Cell Renal Carcinoma, ccRCC, 75%)^[3]、乳头状肾细胞癌 (Papillary Renal Cell Carcinoma, pRCC, 16%)^[4] 和嫌色细胞癌 (Chromophobe Renal Cell Carcinoma, chRCC, 7%)^[5]。ccRCC 主要由其含有的透明细胞定义, 占肾脏所有癌症数目的 75% 左右。在原先的肾小管部位, 肾小管上皮细胞由于基因表达的变化导致脂质代谢障碍, 使脂肪在肾小管上皮细胞内堆积, 从而形成透明细胞。ccRCC 的基因组测序揭示了几个主要驱动突变, 包括 VHL、PBRM1、BAP1、PTEN、FLCN 和 SETD2 等^[6]。随着对肾细胞癌遗传因素研究的不断深入, 研究者发现 DNA 序列以外的调控机制 (表观遗传学调控) 异常在肿瘤的发生、发展过程中也起到了非常重要的作用^[7]。

SETD2 (SET domain-containing 2) 是目前报道的唯一的三甲基化转移酶, 能够催化组蛋白 H3 上第 36 位赖氨酸的三甲基化^[8]。SETD2 最早被分离于人类造血干细胞中, 刚开始被认为与亨廷顿病有关^[9]。SETD2 的主要功能结构域是由 AWS 结构域、SET 结构域和 Post-SET 结构域构成的。SETD2 具有组蛋白甲基转移酶活性, 同时被证明参与包括转录调控、染色体分离、DNA 损伤修复和选择性剪接在内的多种生物学过程^[10]。SETD2 突变或功能的缺失, 使表观遗传调控失衡, 最终导致肿瘤的发生, 如肺癌^[11]、肠癌^[12] 和胰腺癌^[13] 等。SETD2 还在染色质标记相互作用和非组蛋白过程中起到重要作用^[14]。研究表明, 在肾细胞癌特别是透明细胞肾细胞癌中, 临床数据检测到 SETD2 存在高频率突变。在临床上, 透明细胞肾细胞癌中 SETD2 基因的突变比例大约是 16%, 是突变率排名第三的基因, 仅次于 VHL 和 PBRM1^[15]。SETD2 的突变主要发生在 3 号染色体短臂 (3p21 区) 上, 该突变造成了 SETD2 基因 C-端缺失, 使细胞 H3K36me3 水平下降, 引起下游

信号通路异常。

值得一提的是, 在 ccRCC 中, VHL 是突变率最高的基因, 突变率高达 50%^[7]。VHL 位于 3 号染色体上, 与多种高度转移性疾病相关。VHL 是 E3 连接酶复合物中的底物识别组件, E3 泛素连接酶能够通过识别并泛素化 HIF1 α 和 HIF2 α , 从而通过蛋白酶水解途径降解 HIF1 α 和 HIF2 α 。在与 VHL 缺失相关的疾病中, VHL 的缺失能够引起 E3 连接酶水平的下降, 使 HIF1 α 和 HIF2 α 无法正常降解并导致其异常积累, HIF 的靶基因将被不受控制地激活, 促进血管的生成。

对于肾细胞癌的研究, 基因敲除小鼠模型的建立是必不可少的, 尤其是多种基因敲除的小鼠模型, 如 VHL-PBRM1、VHL-BAP、VHL-p53-Rb^[16] 等小鼠模型。这些模型探索了各种高突变基因在肾细胞癌中的作用与机制, 为肾细胞癌的治疗提供了新的靶点与思路。本研究为了更好地探索 SETD2 在肾细胞发生、发展中的作用, 利用在肾细胞癌研究中最常用的 VHL 敲除基因模型, 在此基础上进一步敲除 SETD2, 并探究后续分子机制。本文研究了 SETD2 在肾细胞癌发生、发展过程中的作用机制。此外, VHL-SETD2 双敲模型的建立丰富了现有的小鼠肾癌模型, 尤其是补充了组蛋白修饰 (如 H3K36me3) 缺陷型肾癌病人和动物模型。

1 实验方法及材料

1.1 小鼠模型的构建

SETD2^{n/n} 小鼠购自上海南方模式生物科技股份有限公司。Ksp^{Cre} (B6.Cg-Tg (Cdh16-cre) 91Igr/J) 和 VHL^{n/n} 小鼠购自 Jackson 实验室, Ksp^{Cre} 以特异识别并敲除肾远端小管中 LoxP 标记的基因位点。SETD2^{n/n} 小鼠与 Ksp^{Cre} 小鼠交配生成 Ksp^{Cre};SETD2^{n/n}, 简称 SETD2^{KO} 小鼠。VHL^{n/n} 小鼠与 Ksp^{Cre} 小鼠交配生成 Ksp^{Cre};VHL^{n/n}, 简称 VHL^{KO} 小鼠。SETD2^{KO} 小鼠与 VHL^{n/n} 小鼠交配生成 Ksp^{Cre};VHL^{n/n};SETD2^{n/n}, 简称 VHL^{KO};SETD2^{KO} 小鼠。本实验所使用的小鼠均为 C57BL/6 背景。所有动物实验操作均遵守上海交通大学生物医学工程学院 Med-X 研究院的生物安全和伦理准则。实验方案通过了动物伦理委员会的审核, 伦理编号为 202201027。实验小鼠均在上海交通大学生物医学工程学院 SPF 级别动物房中饲养。饲养条件为: 室温 22 ~ 24℃; 空气湿度 45% ~ 55%; 照明灯光每 12 小时交替照明或关闭。

1.2 肾功能生化检测

为了探究基因小鼠模型 VHL^{-KO};SETD2^{-KO} 与 VHL^{-KO} 中肾小管上皮细胞 SETD2 基因表达情况改变后对肾小管功能的影响情况,我们检测了血清中两种重要的肾脏重吸收底物尿素氮和肌酐的含量,以测定 SETD2 的改变对小鼠肾脏尤其是肾小管功能的损伤情况。步骤如下。①将小鼠固定在固定台上,尾部自然下垂。②用棉布蘸取 60℃左右的干净的水,擦拭小鼠的尾部。③用干净的手术剪刀剪去小鼠的尾部,收集血液,防止溶血。④将收集好的血液在室温中放置 30 分钟,使血细胞沉淀,低速离心,析出血清(无须使用抗凝剂),将提取的血清上机检测。检测公司为武汉赛维尔生物科技有限公司。

1.3 小鼠肾脏原代肾小管上皮细胞制备

步骤如下。①将剪碎的肾脏组织放置于 80 目不锈钢筛网上,用干净的研磨器在不锈钢筛网上轻轻研磨;②用 PBS 溶液冲洗不锈钢筛网,至培养皿中,将培养皿中的网下液体转移至倒置的 70 μ m 筛网上,取走过滤的液体。③将 70 μ m 筛网正置放于收集容器上,用 PBS 将筛网上的组织冲洗下来至收集容器中。④取得的液体经 4℃、2 000rpm 离心 10 分钟,去上清。

1.4 RNA 分离和定量 RT-PCR

从提取的肾小管上皮细胞中提取总 RNA,使用 RNA 提取试剂盒(BioTeke),根据使用说明书提取总 RNA。总 RNA 利用 RT 试剂盒进行逆转录(Takara)。随后对 cDNA 进行 TB green 实时 PCR 分析。采用 GAPDH 对结果进行归一化处理,数据以均数 \pm 标准差表示。

1.5 蛋白印迹实验(Western blotting)

小鼠肾小管上皮细胞样品在添加蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 RIPA 缓冲液(Beyotime, P0013B)中裂解。使用 BCA 蛋白测定法(Thermo)测定蛋白质浓度,然后将蛋白加入 SDS-PAGE 上样缓冲液,于 98℃加热套中加热 10 分钟进行蛋白变性处理。使用 6%和 10% SDS-PAGE 凝胶分离蛋白质,然后转移到聚偏氟乙烯膜或硝化纤维膜(Millipore)。将膜用 5%封闭液在室温下封闭 1.5 小时,随后在 4℃下用一抗孵育过夜,然后用二抗孵育 1 小时。抗体信息:SETD2 (LS-C332416), histone H3 (trimethylK36) (ab9050), Antibody against histone H3 (CST #9715)。

1.6 免疫组织化学染色和 H&E 染色

固定组织切片经 10%缓冲福尔马林固定后,用苏木精和伊红(H&E)染色。为了进行免疫组化染色,切片脱蜡,再水化,用抗原回收柠檬酸缓冲液处理,用 3% H₂O₂ 淬灭。以 5% BSA 为封闭剂,室温下封闭 1 小时。随后,在 4℃下一抗孵育 12~16 小时。抗体信息:CA9(Novo Biologic, NB100-417), Ki67(Abcam, ab15580)。

1.7 小鼠肾脏超声造影

将目的小鼠放入麻醉诱导盒内,麻醉。在小鼠腹部均匀涂抹脱毛膏,在脱毛后的腹部肾脏位置均匀涂抹适量耦合剂,并将小鼠用胶带固定在操作台上,将超声探头放在肾脏大致所在位置并超声获取影像。本实验所使用的超声造影仪器购买自 Visual Sonics。

1.8 RNA-seq

从 10 周龄左右的 VHL^{-KO};SETD2^{-KO} 小鼠和 VHL^{-KO} 小鼠肾脏肾小管上皮细胞中提 RNA。利用 Illumina (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) 的 NEBNext 超定向 RNA 文库准备试剂盒构建测序文库。文库进行 Illumina 测序,测序方式为两端配对 2 \times 150。通过 FAST-QC 对原始测序数据进行评估,包括核苷酸质量分布、位置特异性测序质量、GC 含量、PCR 重复比例、Kmer 频率等。使用 HISAT2 软件将干净的 reads 映射到小鼠基因组。使用 RPKM (Reads Per Kb per Million reads) 从数据中计算基因表达。使用 KEGG、GO 和 GSEA 对实验数据进行分析。统计显著性原则是 $p < 0.05$, Fold Change ≥ 1.5 。

1.9 统计学分析

除非另有说明,所有实验至少重复 3 次。数据以均数 \pm 标准差表示,采用 GraphPad Prism 8.0.2 软件,采用双因素方差分析或 Student's *t* 检验进行统计学意义分析。 $p < 0.05$ 表示有统计学意义。 $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$; $****p < 0.0001$ 。

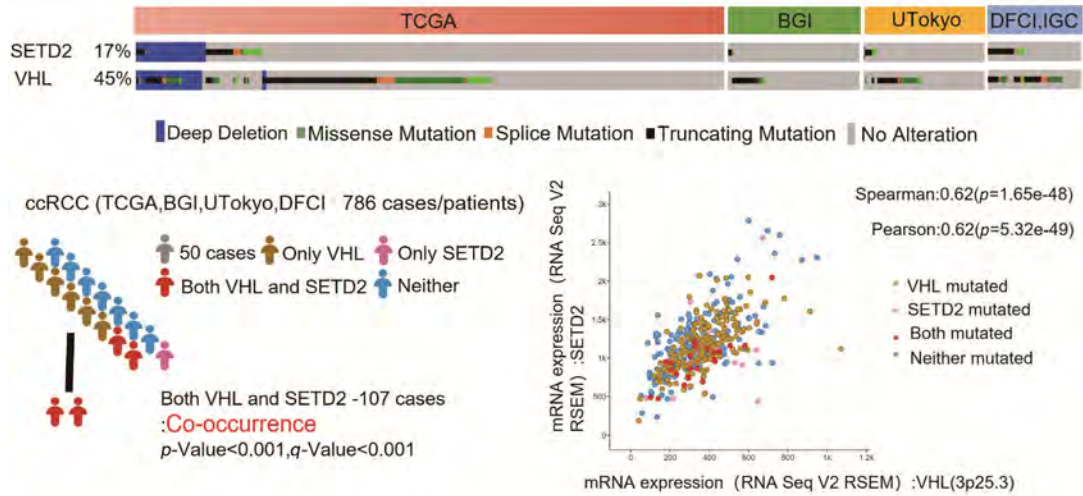
2 实验结果

2.1 SETD2 与 VHL 在 ccRCC 中具有共突变且表达正相关

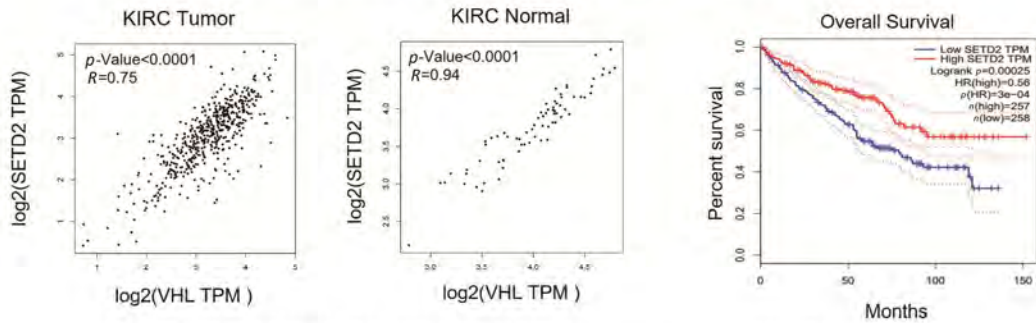
根据 TCGA、BGI、UTokyo、DFCI 和 IGC 中的临床数据可知,SETD2 与 VHL 在 ccRCC 患者中均有高突变率,并且在诸多病例中 SETD2 与 VHL 均具有

缺失突变。进一步分析 ccRCC 患者数据，在 786 例患者中，有 107 例患者含有 SETD2 与 VHL 的双突变，这一结果表明，SETD2 与 VHL 在 ccRCC 中具有共突变 [见图 1 (a)]。此外，根据 ccRCC 患者肾脏和正常肾脏中 SETD2 与 VHL 的 mRNA 表达数据，分析发现 SETD2 与 VHL 的 mRNA 表达呈正相关 [见图 1 (b)]。

同时，SETD2 的表达水平与 ccRCC 患者的生存率相关，SETD2 高表达的 ccRCC 患者生存率高于 SETD2 低表达的 ccRCC 患者 [见图 1 (c)]。以上数据显示，SETD2 与 VHL 在 ccRCC 中具有共突变且表达正相关，这表明在 VHL 缺失的条件下，研究 SETD2 在 ccRCC 中的作用具有临床意义。



(a) 临床癌症患者数据中SETD2与VHL的突变率及共突变率



(b) 临床数据中SETD2与VHL的mRNA表达呈正相关

(c) SETD2与ccRCC患者生存率的关系

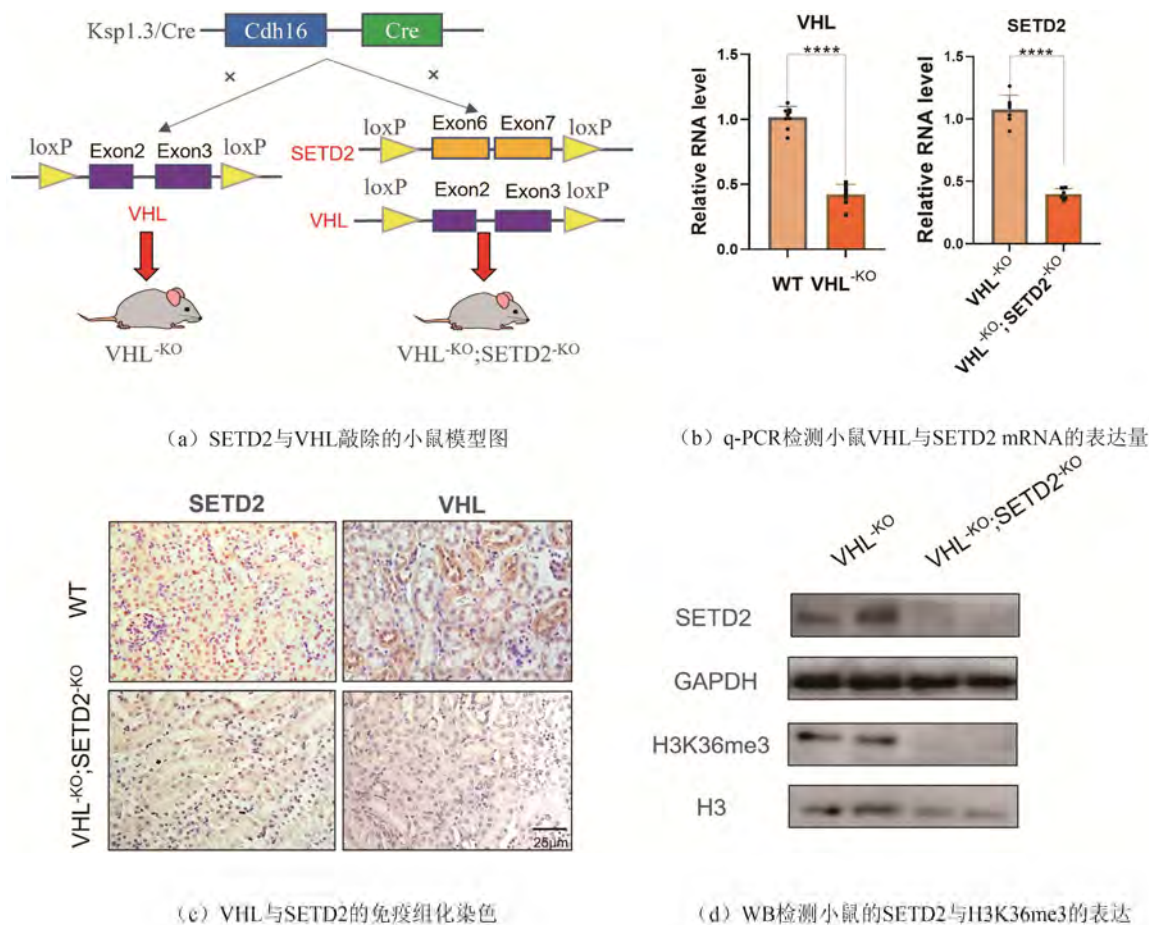
图1 SETD2 与 VHL 在 ccRCC 中的临床相关性

Fig.1 Clinical relevance of SETD2 and VHL in ccRCC

2.2 VHL^{-KO};SETD2^{-KO} 小鼠模型的建立

为了探究 SETD2 在 VHL 缺失的条件下能否导致 ccRCC 及其发挥的作用，本研究首先利用基因工程技术得到了 SETD2-floxed 小鼠与 VHL-floxed 小鼠，并通过与特异性表达在肾小管上皮细胞的 Ksp1.3/Cre 小鼠品系杂交，构建了 SETD2 与 VHL 特异性敲除的小鼠品系^[17]。此外，利用 VHL 特异性敲除的小鼠品系与 SETD2-floxed 小鼠品系杂交，得到 SETD2 和 VHL 双敲小鼠品系。配种产生的 Ksp^{Cre+}; VHL^{flox/flox} 小鼠简称 VHL^{-KO} 小鼠，Ksp^{Cre+}; VHL^{flox/flox}; SETD2^{flox/flox} 小鼠简称 VHL^{-KO};

SETD2^{-KO} 小鼠 [见图 2 (a)]。q-PCR 结果显示，VHL^{-KO}; SETD2^{-KO} 小鼠肾脏中 VHL 与 SETD2 的 mRNA 表达与对照组相比均显著降低 [见图 2 (b)]。此外，根据免疫组织化学染色结果，与对照组相比，SETD2 阳性细胞与 VHL 阳性细胞的比例显著降低 [见图 2 (c)]。同时，利用 WB 检测 VHL^{-KO}; SETD2^{-KO} 小鼠肾脏中 SETD2 与组蛋白 H3 第 36 位赖氨酸的三甲基化 (H3K36me3) 水平，结果显示 VHL^{-KO}; SETD2^{-KO} 小鼠中 SETD2 与 H3K36me3 水平均比 VHL^{-KO} 小鼠低 [见图 2 (d)]。以上数据证明 VHL^{-KO}; SETD2^{-KO} 小鼠模型构建成功。

图2 VHL^{KO}; SETD2^{KO}小鼠模型的建立Fig.2 Establishment of VHL^{KO}; SETD2^{KO} mouse model

2.3 在 VHL 缺失的条件下, SETD2 缺失导致 ccRCC 的产生

为了探究在 VHL 缺失的条件下 SETD2 的缺失对肾脏的影响, 我们首先利用超声造影技术对不同周龄的 VHL^{KO}; SETD2^{KO} 小鼠肾脏和 VHL^{KO} 小鼠肾脏进行观察, 结果显示 VHL^{KO}; SETD2^{KO} 小鼠肾脏阴影面积远远大于 VHL^{KO} 小鼠肾脏 [见图 3 (a)], 这说明 VHL^{KO}; SETD2^{KO} 小鼠肾脏结构遭到破坏。进一步分析, HE 结果显示, 30 周龄的 VHL^{KO}; SETD2^{KO} 小鼠肾脏出现了大量的组织学异常表型, 如 THP 标记的远端小管形成的囊泡 [见图 3 (b)]。根据生化检测发现, VHL^{KO}; SETD2^{KO} 小鼠血清中尿素氮和肌酐的含量显著高于对照组, 说明小鼠肾脏功能受到了严重损伤 [见图 3 (c)]。此外, VHL^{KO}; SETD2^{KO} 小鼠中 ccRCC 标记物 Ki67、CA9 阳性细胞远远大于对照

组, 并且在 50 周龄的实验鼠中能够看到 ccRCC 病灶 [见图 3 (d)]。上述数据表明, 在 VHL 缺失的条件下, SETD2 的缺失能够导致小鼠肾脏出现肾小管结构异常、囊泡增多等组织病变现象, 并在小鼠 50 周龄时出现透明细胞等 ccRCC 病症。

2.4 SETD2 的缺失导致 Wnt/ β -catenin、FoxO 信号通路的上调

为了探索在 VHL 缺失的条件下 SETD2 缺失导致 ccRCC 产生的机制, 我们使用从 10 周龄的 VHL^{KO} 小鼠和 VHL^{KO}; SETD2^{KO} 小鼠中新鲜分离的原代小管上皮细胞 (PTECs) 进行 RNA-seq。结果显示, 与 VHL^{KO} PTECs 相比, VHL^{KO}; SETD2^{KO} 小鼠 PTECs 转录组显著改变 [见图 4 (a)]。通过 DEseq 软件筛选出样本中表达有明显差异的基因, 筛选标准按照经验选择 Fold Change ≥ 1.5 且 $p \leq 0.05$, 共有 2 659 个基因表达

上调, 2 617 个基因表达下调 [见图 4 (a) 和 (b)]。对差异基因进行 GO 富集分析, 从生物过程 (Biological Process, BP)、分子功能 (Molecular Function, MF) 和细胞组成 (Cellular Component, CC) 3 个部分揭示了 SETD2 失活显著富集了大量 ccRCC 形成相关的基因通路, 如脂质代谢、氧化还原反应等过程 [见图 4(c)]。此外, 为了更好地了解 SETD2 在 ccRCC 发生、发展过程中发挥的作用, 我们利用 KEGG 通路富集分析来整合该模型中基因组、化学和系统功

能信息。结果显示, SETD2 的缺失导致了 Wnt/ β -catenin、FoxO 等诸多致癌通路上调。此外, 根据 GSEA 富集分析, VHL^{-KO}; SETD2^{-KO} 小鼠中 Wnt/ β -catenin、FoxO 信号通路确实得到了富集 [见图 4(d)]。以上结果显示, SETD2 在肾脏中可能会抑制 Wnt/ β -catenin、FoxO 等致癌通路的激活。SETD2 的缺失导致 Wnt/ β -catenin、FoxO 等信号通路被激活, 从而在 VHL 缺失的条件下, 导致小鼠肾脏形成 ccRCC。

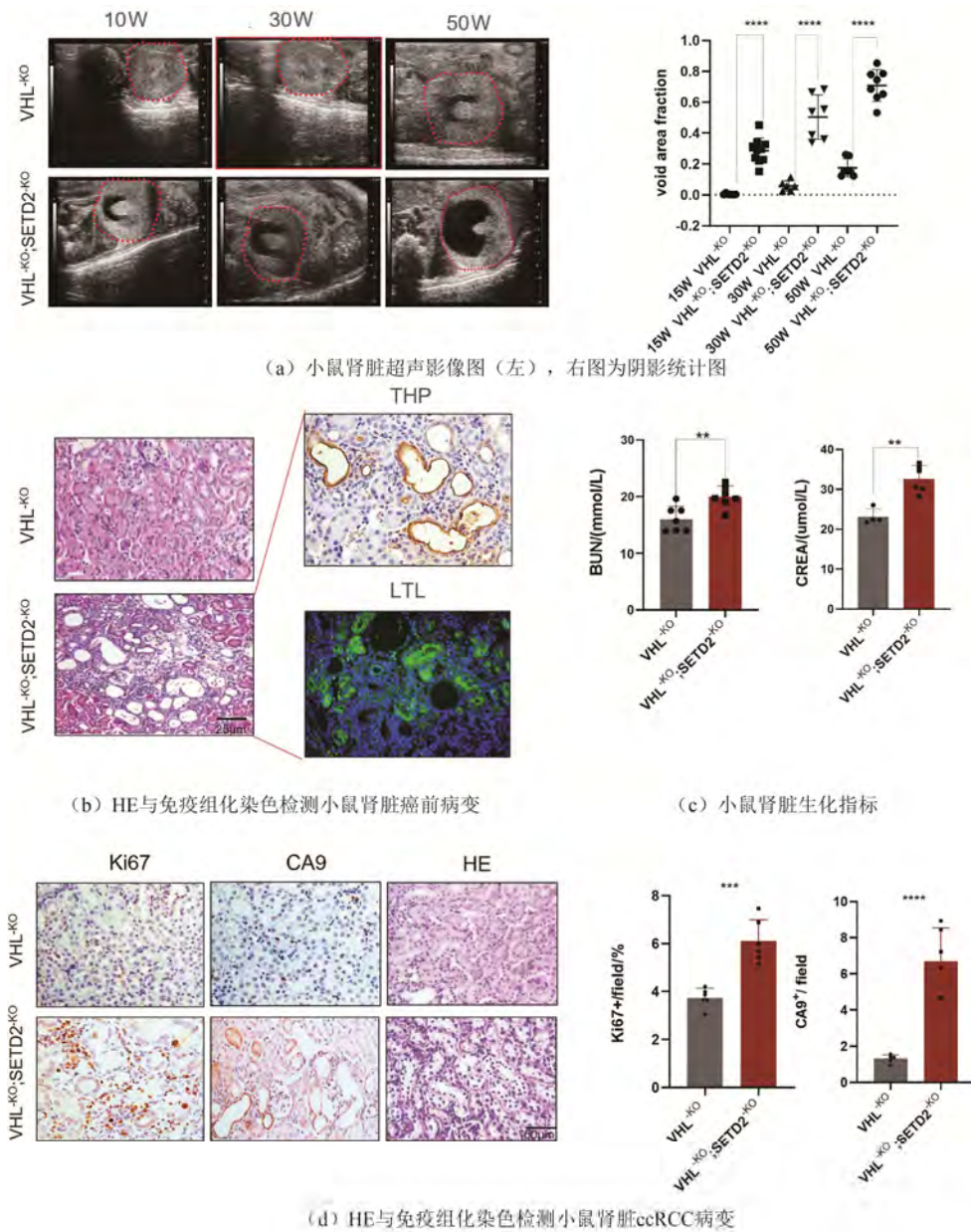


图 3 在 VHL 缺失的条件下, SETD2 的缺失导致 ccRCC 的产生

Fig.3 In the absence of VHL, the absence of SETD2 leads to the generation of ccRCC

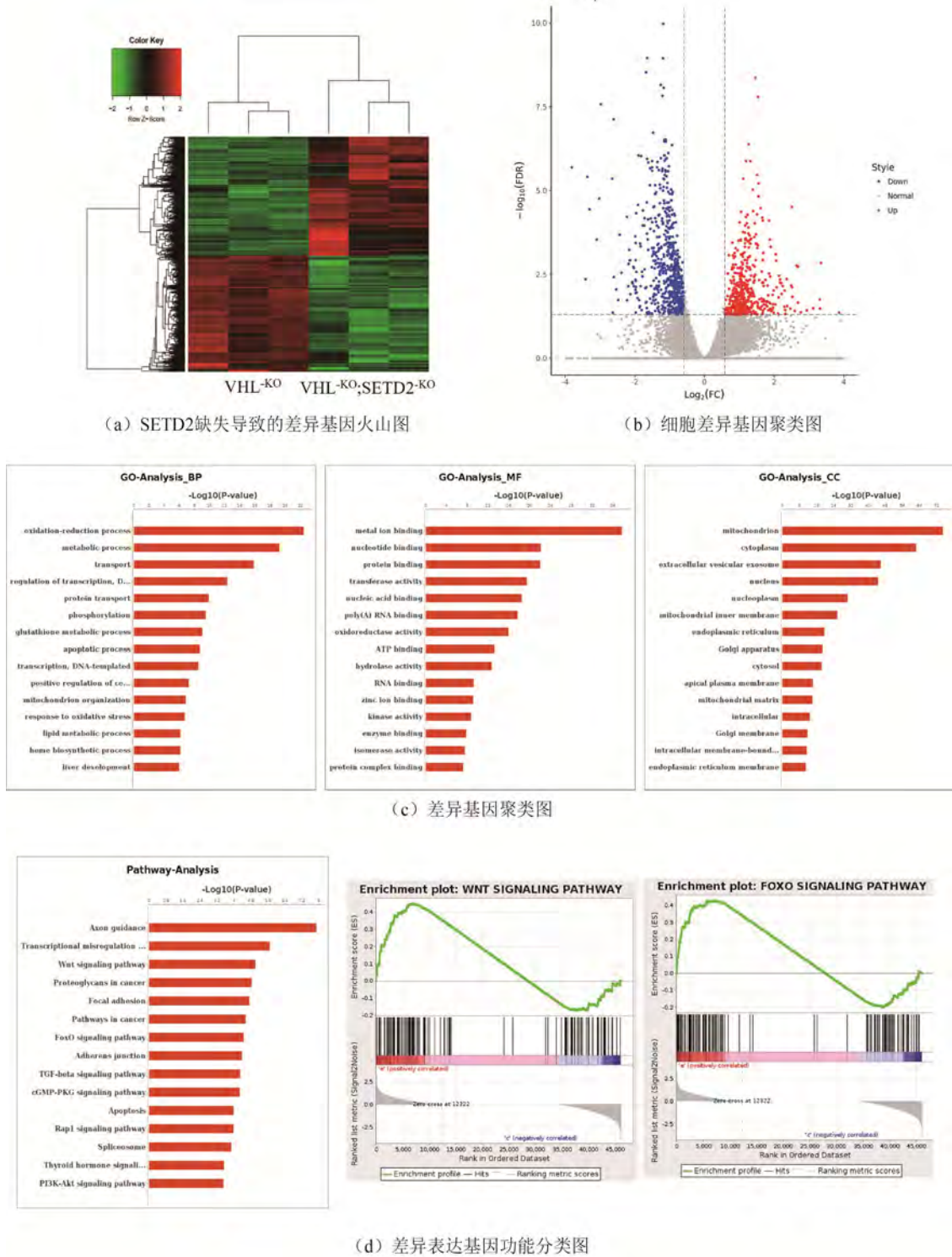


图 4 SETD2 的缺失导致多种致癌通路上调

Fig.4 The absence of SETD2 leads to up-regulation of multiple oncogenic pathways

3 结论

目前, 很多研究表明, SETD2 作为重要的抑癌基因, 在许多癌症中都起到重要的抑癌作用。SETD2 作为肾细胞癌患者中突变率第三的基因, 已有部分研究

证明了 SETD2 在多囊肾病转化到 ccRCC 过程中的作用^[18], 以及 SETD2 通过影响染色质的可及性来影响 ccRCC^[19]。根据临床研究, SETD2 与突变率最高的 VHL 之间具有共突变, 然而这部分的研究是空白的。

SETD2 与 VHL 的高临床相关性使该研究更具有临床意义。

本研究利用 TCGA 等癌症数据库, 首先分析了 SETD2 与 VHL 在 ccRCC 患者中具有很高的共突变率, 并且 SETD2 与 VHL 的表达呈正相关, 这使 SETD2 与 VHL 共同缺失的研究具有临床意义。此外, 本研究构建了小鼠肾小管特异性敲除 SETD2 与 VHL 的基因小鼠模型, 利用该模型及后续表型分析发现, SETD2 的缺失导致小鼠肾脏远端小管形成了大量的囊泡等组织学病变。根据 HE 染色结果和 ccRCC 标志物染色结果发现, 在 VHL 缺失的条件下, SETD2 的缺失能够使小鼠肾脏出现 ccRCC 病灶。转录组测序分析显示, SETD2 的缺失与脂质代谢和氧化还原反应等 ccRCC 形成相关的生物过程相关。此外, 通过 KEGG 与 GSEA 发现 Wnt/ β -catenin、FoxO 等致癌通路在 SETD2 缺失后被显著激活。总结来说, SETD2 能够抑制 Wnt/ β -catenin、FoxO 等致癌通路从而抑制 ccRCC 的形成。

本研究通过对临床数据的分析和对 SETD2 与 VHL 敲除小鼠模型的分析, 并结合转录组测序技术、GO、KEGG 及 GSEA 等分析技术揭示了 SETD2 在抑制 ccRCC 的形成过程中发挥着重要的作用, 并且找到了可能的发挥作用的通路, 如 Wnt/ β -catenin、FoxO 信号通路, 为临床 VHL 与 SETD2 双突变患者的临床检测和治疗提供了新的靶点。本研究为 ccRCC 疾病的检测和治理提供了新的理论依据。

参考文献

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, *et al.* Cancer statistics, 2022 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2022, 72(1):7-33.
- [2] CAPITANIO U, MONTORSI F. Renal cancer [J]. *Lancet*, 2016, 387(10021):894-906.
- [3] Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma [J]. *Nature*, 2013, 499(7456):43-49.
- [4] Cancer Genome Atlas Research Network, LINEHAN W M, SPELLMAN P T, *et al.* Comprehensive molecular characterization of papillary renal-cell carcinoma [J]. *N Engl J Med*, 2016, 374(2): 135-145.
- [5] DAVIS C F, RICKETTS C J, WANG M, *et al.* The somatic genomic landscape of chromophobe renal cell carcinoma [J]. *Cancer Cell*, 2014, 26(3): 319-330.
- [6] DIZMAN N, PHILIP E J, PAL S K. Genomic profiling in renal cell carcinoma [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2020, 16(8):435-451.
- [7] DALGLIESH G L, FURGE K, GREENMAN C, *et al.* Systematic sequencing of renal carcinoma reveals inactivation of histone modifying genes [J]. *Nature*, 2010, 463(7279):360-363.
- [8] HU M, SUN X J, ZHANG Y L, *et al.* Histone H3 lysine 36 methyltransferase Hypb/Setd2 is required for embryonic vascular remodeling [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(7):2956-2961.
- [9] FABER P W, BARNES G T, SRINIDHI J, *et al.* MacDonald ME. Huntingtin interacts with a family of WW domain proteins [J]. *Hum Mol Genet*, 1998, 7(9): 1463-1474.
- [10] KANU N, GRÖNROOS E, MARTINEZ P, *et al.* SETD2 loss-of-function promotes renal cancer branched evolution through replication stress and impaired DNA repair [J]. *Oncogene*, 2015, 34(46):5699-5708.
- [11] WALTER D M, VENANCIO O S, BUZA E L, *et al.* Systematic in vivo inactivation of chromatin-regulating enzymes identifies SETD2 as a potent tumor suppressor in lung adenocarcinoma [J]. *Cancer Res*, 2017, 77(7):1719-1729.
- [12] YUAN H, LI N, FU D, *et al.* Histone methyltransferase SETD2 modulates alternative splicing to inhibit intestinal tumorigenesis [J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(9): 3375-3391.
- [13] NIU N, LU P, YANG Y, *et al.* Loss of SETD2 promotes Kras-induced acinar-to-ductal metaplasia and epithelia-mesenchymal transition during pancreatic carcinogenesis [J]. *Gut*, 2020, 69(4):715-726.
- [14] CHEN K, LIU J, LIU S, *et al.* Methyltransferase SETD2-mediated methylation of STAT1 is critical for interferon antiviral activity [J]. *Cell*, 2017, 170(3):492-506.e14.
- [15] GOSSAGE L, MURTAZA M, SLATTER A F, *et al.* Clinical and pathological impact of VHL, PBRM1, BAP1, SETD2, KDM6A, and JARID1c in clear cell renal cell carcinoma: VHL, PBRM1, BAP1, JARID1c, SETD2, & KDM6a in CCRCC [J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2014, 53(1):38-51.
- [16] HARLANDER S, SCHÖNENBERGER D, TOUSSAINT N C, *et al.* Combined mutation in Vhl, Trp53 and Rb1 causes clear cell renal cell carcinoma in mice [J]. *Nat Med*, 2017, 23(7): 869-877.
- [17] SHAO X, SOMLO S, IGARASHI P. Epithelial-specific Cre/lox recombination in the developing kidney and genitourinary tract [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13(7): 1837-1846.
- [18] RAO H, LI X, LIU M, *et al.* Multilevel regulation of β -catenin activity by SETD2 suppresses the transition from polycystic kidney disease to clear cell renal cell carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2021, 81(13): 3554-3567.
- [19] XIE Y, SAHIN M, SINHA S, *et al.* SETD2 loss perturbs the kidney cancer epigenetic landscape to promote metastasis and engenders actionable dependencies on histone chaperone complexes [J]. *Nat Cancer*, 2022, 3(2): 188-202.