

Beste Forschungsbeiträge

Pathologe 2008 · [Suppl 2] 29:303–307
 DOI 10.1007/s00292-008-1031-1
 Online publiziert: 29. August 2008
 © Springer Medizin Verlag 2008

V.D. Luu¹ · B. Fischer² · A. von Teichman¹ · G. Boysen¹ · K. Mertz³ · P. Zimmermann⁴ ·
 H. Moch¹ · P. Schraml¹

¹ Institut für Klinische Pathologie, UniversitätsSpital Zürich, Schweiz

² Institut für Computerwissenschaften, ETH Zürich, Schweiz

³ Uniklinik für Dermatologie, Medizinische Universität Wien, Österreich

⁴ Institut für Pflanzenwissenschaften, ETH Zürich, Schweiz

Von-Hippel-Lindau- Gen-Mutationstypen

Assoziation mit Genexpressionssignaturen in klarzelligem Nierenzellkarzinomen

Die autosomal-dominant vererbte Von-Hippel-Lindau- (VHL-)Krankheit ist prädisponierend für die Entwicklung von Hämangioblastomen des zentralen Nervensystems, Angioblastomen, Pankreas-tumoren, Nierenzellkarzinomen (NZK), und Phäochromozytomen [11]. Das für das VHL-Syndrom verantwortliche Gen, *VHL*, ist auf Chromosom 3p25-p26 lokalisiert und wurde 1993 kloniert [10]. NZK im Rahmen des VHL-Syndroms entsprechen histologisch dem klarzelligem Subtyp (kNZK). Dieser Subtyp wird auch am häufigsten bei sporadischen NZK gesehen [13]. Wie bei den VHL-Syndrom-assoziierten kNZK weisen die meisten spo-

radischen kNZK einen Verlust von Chromosom 3p [21] und eine inaktivierende Mutation im *VHL*-Gen auf dem zweiten 3p-Arm auf [5]. Diese Daten sprechen dem *VHL*-Gen eine tumorsuppressive Wirkung zu, deren Ausfall eine wichtige Rolle bei der Entstehung des kNZK spielt.

Interessant ist, dass das *VHL*-Mutationsmuster in der VHL-Erkrankung mit der klinischen Subklassifikation hinsichtlich ihrer Prädisposition für die 3 Tumortypen Hämangioblastom, NZK und Phäochromozytom korreliert. Generell werden „Missense-Mutationen“ mit der Entwicklung einer Typ-2-Erkrankung as-

soziiert (VHL-Syndrom mit Phäochromozytom), während Mutationen, die zu einem verkürzten VHL-Protein führen, mit Typ-1-Erkrankung (VHL-Syndrom ohne Phäochromozytom) in Verbindung gebracht werden. Darüber hinaus sind spezifische *VHL*-Punktmutationen prädisponierend für eine Subtypisierung des VHL-Syndroms. Zum Beispiel begünstigt ein Y98H-Austausch den Typ 2A (Typ 2 mit Hämangioblastom), während R167 W die Entwicklung eines Typ-2B-Syndroms (Typ 2 ohne Hämangioblastom) zur Folge hat [2]. Derartige Genotyp-Phänotyp-Korrelationen konnten bisher in sporadischen kNZK nicht beobachtet werden.

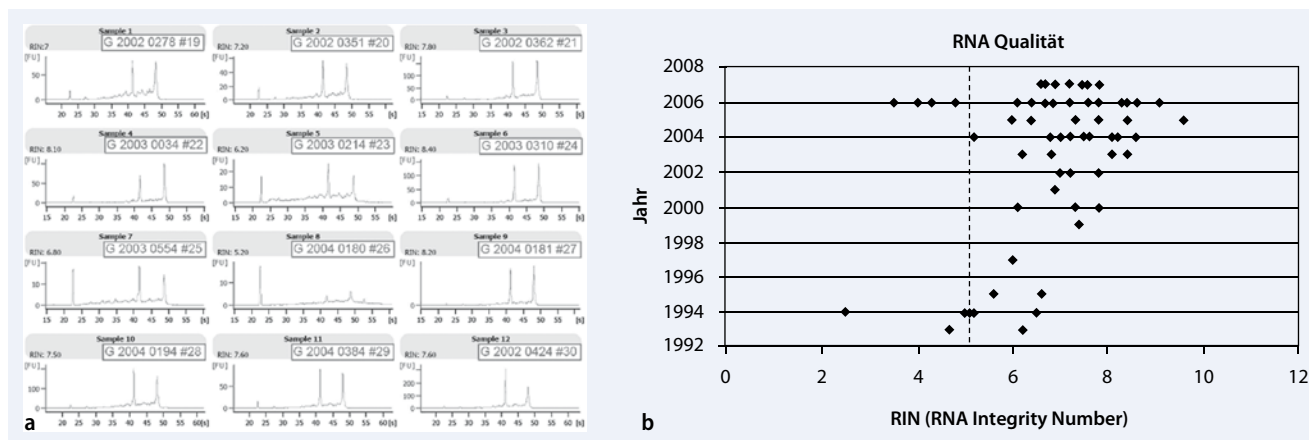


Abb. 1 **a** Agilent-Bioanalyzer-2100-Elektropherogramme von 12 NZK-RNA-Proben. **b** „RNA Integrity Number-“ (RIN-) Werte der verwendeten RNA von gesammelten Tumorgeweben aus den Jahren 1993 bis 2007

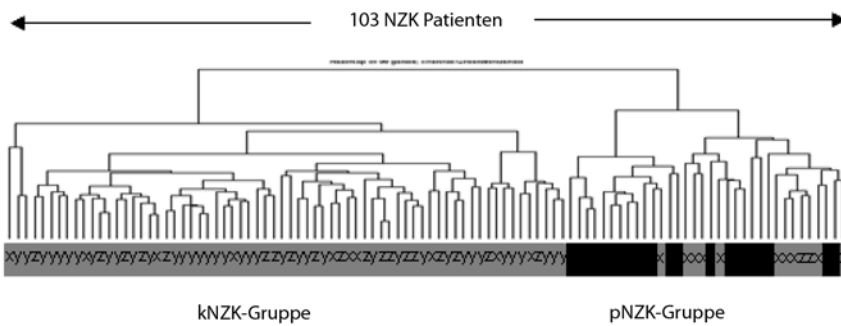


Abb. 2 ▲ „Hierarchical clustering“ von 103 NZK (82 knzK, *grau*; 21 pnzK, *schwarz*) anhand des Genexpressionsprofils in eine knzK- und eine pnzK-Gruppe (x VHL-Wildtyp, y VHL-missense-Mutation, z VHL-loss-of-function-Mutation)

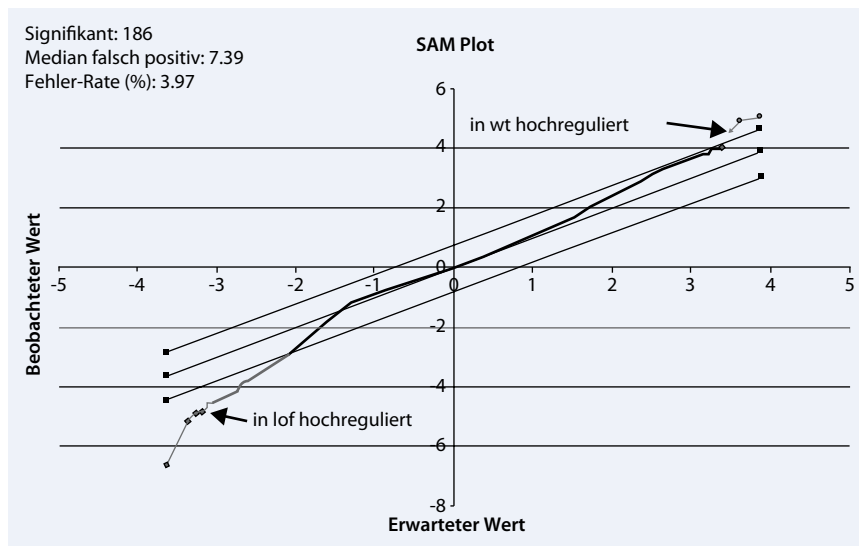


Abb. 3 ▲ Differenziell exprimierte Gene in VHL-Wildtyp (wt)- und „VHL-loss-of-function (lof)-kNzK“ in *grau* (nichtsignifikante Gene in *schwarz*) mittels SAM-plot

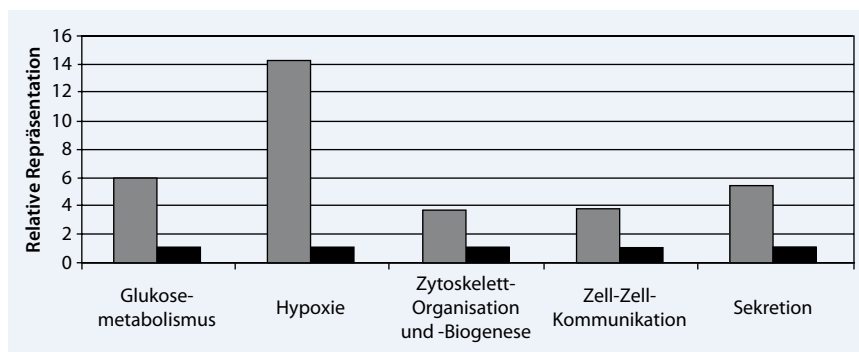


Abb. 4 ▲ Überrepräsentierte biologische Funktionsgruppen ($p < 0,05$) der differenziell regulierten Gene zwischen VHL-Wildtyp- und „VHL-loss-of-function-kNzK“ (*graue Balken*) im Vergleich zur Normalbedingung (*schwarze Balken*)

Das VHL-Protein ist multifunktionell. Es ist an der Stabilisierung von Mikrotubuli und primären Zilien sowie an der Regulation der Matrixbildung oder von p53 beteiligt [7].

Die am besten charakterisierte Funktion von pVHL ist jedoch seine Fähigkeit, den Hypoxie-induzierten Faktor alpha (HIF- α) zu regulieren. Durch die Bindung mit dem VHL-Protein, welches ein Bestandteil des E₃-Ubiquitin-Ligase-Kom-

plexes ist, wird HIF- α ubiquitinyliert und anschließend durch das Proteasom 26S abgebaut. HIF- α bildet mit HIF- β einen Transkriptionsfaktor, welcher Gene aktiviert, die u. a. bei der Zellproliferation, Gefäßneubildung, Stoffwechselaktivität und der Bildung der extrazellulären Matrix involviert sind [9]. Mutationen, die zu einer Inaktivierung der VHL-Funktion(en) führen, spielen daher eine zentrale Rolle bei der Entstehung des knzK.

Genexpressionsanalysen unter Verwendung von Mikroarrays haben ein großes Potenzial für ein umfassendes Verständnis der zellulären Prozesse bei der Tumorentstehung und -progression. Es konnte gezeigt werden, dass mittels molekularer Gensignaturen sowohl der klinische Verlauf von knzK-Patienten [16, 22] als auch der histologische Subtyp von Nierentumoren äußerst exakt vorhergesagt werden kann [17]. Neben einer molekularen Klassifikation geben differenziell exprimierte Gene in den einzelnen Subtypen auch Aufschluss über die Tumorbiologie und erleichtern dadurch die Entdeckung von neuen molekularen Markern.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war die Verknüpfung von Genexpressionsdaten mit bestimmten VHL-Mutationstypen, um die Konsequenz von VHL-Sequenzalterationen auf die Genexpression in knzK besser zu verstehen.

Material und Methoden

Tumorgewebe

115 NZK, zwischen 1993 und 2007 am UniversitätsSpital Zürich diagnostiziert, wurden histologisch befundet (H.M.). Die Bewertung der Morphologie wurde von jedem Tumor anhand einer HE-Färbung und nach der 2004-Nierentumor-Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO) [3] durchgeführt.

RNA-Extraktion und Qualitätsanalyse

RNA wurde aus gefrorenen Tumorgeweben von 94 knzK- und 21 papillären NZK- (pnzK-)Patienten mittels RNeasy Mini (Qiagen, Hilden) extrahiert und durch Ethanolpräzipitation konzentriert. Die RNA-Qualität wurde mit Hilfe des

Agilent Bioanalyzer 2100 gemessen. RNA mit einer „RNA Integrity Number“ (RIN) <5 wurde für weitere Untersuchungen nicht verwendet.

Affymetrix Mikroarrays und Genexpressionsanalysen

Total-RNA aus NZK-Patienten wurde revers transkribiert, markiert und auf HG-U133A High-Thruput Arrays (Affymetrix, Santa Clara, USA) hybridisiert. Die Genchips wurden in einem 96-Format mit einem Affymetrix-HT-Scanner eingelesen. Dieser Prozess wurde am „Broad Institute of MIT and Harvard Medical School“ (Cambridge, USA) durchgeführt. Die Affymetrix-Rohdaten wurden mittels GCRMA normalisiert [19]. „Significance Analysis of Microarrays“ [18] wurde angewendet, um differenziell regulierte Gene zwischen kNZK und pNZK, bzw. *VHL*-Wildtyp- und „-loss-of-function“-kNZK, zu identifizieren. Signifikante Gene wurden für das „hierarchical clustering“ [4] verwendet.

VHL-Mutationsanalysen

Genomische DNA wurde aus 82 gefrorenen kNZK mittels DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Hilden) isoliert. Die Amplifikation der 3 *VHL*-Exons erfolgte wie bereits beschrieben [15]. Für die Sequenzierung wurden der BigDye® Terminator v1.1. Cycle kit (Applied Biosystems) und dieselben Primer (vorwärts und rückwärts) wie für die Polymerasekettenreaktion (PCR) verwendet. Die Sequenzanalysen wurden am AbiPrism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) durchgeführt.

Ergebnisse

RNA-Qualität

Der RIN-Wert gibt Aufschluss über die RNA-Qualität. Nur 12 von 115 (10,4%) Tumoren wiesen einen RIN-Wert von <5 auf und wurden von der Genexpressionsanalyse ausgeschlossen. Agilent-Bioanalyzer-Elektropherogramme von einigen isolierten RNA-Proben sind in **Abb. 1 a.** gezeigt. Die RIN-Werte und die dazugehörigen Jahrgänge wurden gegeneinander aufgetragen, um mögliche altersbedingte

Pathologie 2008 · [Suppl 2] 29:303–307 DOI 10.1007/s00292-008-1031-1
© Springer Medizin Verlag 2008

V.D. Luu · B. Fischer · A. von Teichman · G. Boysen · K. Mertz · P. Zimmermann · H. Moch · P. Schraml

Von-Hippel-Lindau-Gen-Mutationstypen. Assoziation mit Genexpressionssignaturen in klarzelligen Nierenzellkarzinomen

Zusammenfassung

Fragestellung. Der Von-Hippel-Lindau- (*VHL*-)Tumorsuppressor ist ein multifunktionelles Protein. *VHL*-Mutationen treten häufig auf im klarzelligen Nierenzellkarzinom (kNZK). Verschiedene Mutationstypen führen vermutlich zu spezifischen p*VHL*-Funktionsveränderungen, die wiederum einen signifikanten Einfluss auf die Genexpression und schließlich auf den Krankheitsverlauf haben dürften. Ziel der vorliegenden Studie ist die Korrelation von Genexpressionssignaturen mit spezifischen *VHL*-Mutationstypen im kNZK.

Methodik. Transkriptomanalyse wurde für 94 kNZK und 21 papilläre NZK (pNZK) mittels Affymetrix HG U133A Genchips durchgeführt. Alle 94 kNZK wurden auf *VHL*-Mutationen analysiert.

Ergebnisse. Ein „hierarchical clustering“ anhand der zwischen kNZK und pNZK differenziell regulierten Gene zeigt eine deutliche Stratifizierung der beiden histologischen Subtypen. 186 Gene wurden zwischen *VHL*-Wildtyp kNZK und kNZK mit mutiertem *VHL*-Gen differenziell exprimiert.

Schlussfolgerung. Unsere Resultate weisen auf eine signifikante Auswirkung von *VHL*-Mutationen auf die Genexpression im NZK hin.

Schlüsselwörter

Nierenzellkarzinom · Von-Hippel-Lindau-Tumorsuppressor · Genexpressionsanalyse · DNA-Microarray · Molekulare Klassifizierung

Von-Hippel-Lindau gene mutation types. Association of gene expression signatures in clear cell renal cell carcinoma

Abstract

Aims. The von-Hippel-Lindau (*VHL*) tumor suppressor is a multifunctional protein. *VHL* mutations are common in sporadic clear cell renal cell carcinoma (ccRCC). Different mutation types may specifically alter p*VHL* functions, which have significant impact on gene expression and, consequently, on the disease outcome. The aim of this study was to identify gene expression signatures that correlate with specific *VHL* gene mutation types in RCC.

Methods. Total RNA and genomic DNA were extracted from 94 frozen clear cell (ccRCC) and 21 papillary RCC (pRCC) specimens from the tumor biobank of Zurich University Hospital. Transcriptome analysis was performed using Affymetrix HG U133A gene chips. All ccRCC tumors were subjected to *VHL* gene mutation analysis.

Results. By applying significance analysis of microarrays genes were identified, which were differentially regulated among the tumor subgroups. Hierarchical clustering based on the expression profile of the most differentially regulated genes resulted in a significant stratification between the two RCC populations. A total of 186 differentially expressed genes were identified by comparing the gene expression profiles of ccRCC with *VHL* loss-of-function mutations and ccRCC with no gene alterations.

Conclusions. The results clearly argue for a significant influence of *VHL* mutations on gene expression profiles in RCC.

Keywords

Renal cell carcinoma · Von-Hippel-Lindau tumor suppressor · Gene expression profiling · DNA microarray · Molecular classification

Tab. 1 Hochregulierte Gene in kNZK

Symbol	Name
<i>FABP7</i>	„Fatty acid binding protein 7, brain“
<i>NDUFA4L2</i>	„NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 4-like 2“
<i>PCSK6</i>	„Proprotein convertase subtilisin/kexin type 6“
<i>REN</i>	„Renin“
<i>SLC6A3</i>	„Solute carrier family 6“ („neurotransmitter transporter, dopamine“)
<i>KNCK3</i>	„Potassium channel, subfamily K, member 3“
<i>NPTX2</i>	„Neuronal pentraxin II“
<i>UBP1</i>	„Ureidopropionase, beta“
<i>ALDOB</i>	„Aldolase B, fructose-bisphosphate“
<i>AGTR1</i>	„Angiotensin II receptor, type 1“
<i>TIE1</i>	„Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1“
<i>ANGPTL4</i>	„Angiopoietin-like 4“
<i>CYP2J2</i>	„Cytochrome P450, family 2, subfamily J, polypeptide 2“
<i>RAMP3</i>	„Receptor (G-protein-coupled) activity modifying protein 3“
<i>PLVAP</i>	„Plasmalemma vesicle associated protein“
<i>KCNN3</i>	„Potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel“
<i>PGF</i>	„Placental growth factor“, „vascular endothelial growth factor-related protein“

Topliste der im Vergleich zu pNZK hochregulierten Gene in kNZK. Kursiv markierte Gene sind als kNZK-Marker in der Literatur bekannt.

Tab. 2 VHL-Mutationen in 82 kNZK-Patienten

20 (24%) Wildtyp		
62 (66%) Mutation	31 (50%) Punktmutation	21 (68%) „missense“ (Typ A)
		10 (32%) „nonsense“ (Typ B)
	29 (47%) Deletion/Insertion	4 (14%) „in frame“ (Typ A)
		25 (86%) „frameshift“ (Typ B)
	2 (3%) Splice-Mutation	

Typ-A-Mutationen: VHL-Sequenzalterationen mit unbekannter biologischer Konsequenz.
 Typ-B-Mutationen: „Loss-of-function-VHL-Mutationen“, die eine Veränderung des Leserasters und damit einen Funktionsverlust von pVHL herbeiführen.

Qualitätsunterschiede der RNA aufzuzeigen (Abb. 1 b.). Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der RNA-Qualität zwischen älteren und neueren Jahrgängen festgestellt werden.

Genexpressionsanalyse von NZK-Patienten

Die SAM-Analyse („significance analysis of microarrays“) identifizierte 5216 signifikant differenziell regulierte Gene zwischen dem papillären und dem klarzelligem Subtyp (Daten nicht gezeigt). Tab. 1 zeigt die „Topliste“ der in kNZK im Vergleich zu pNZK hochregulierten Gene. Viele der identifizierten Gene sind als kNZK-Marker in der Literatur bekannt.

Mittels eines Hierarchical Clusterings anhand der Genexpressionsdaten von den 100 differenziell regulierten Transkripten mit der höchsten Signifikanz zwischen den

beiden Subtypen ließen sich die Patienten in 2 Gruppen kategorisieren (Abb. 2). Der linke Arm beinhaltet ausschließlich kNZK, während der rechte Arm aus pNZK und einigen kNZK-Fällen besteht.

VHL-Mutationsanalyse

Somatische VHL-Mutationen wurden in 62 von 82 (76%) kNZK-Patienten identifiziert. Darunter waren 2 Patienten mit 2 Mutationen. 25 Mutationen waren kleine Deletionen oder Insertionen, welche das Leseraster verändern, 4 waren „In-frame-Deletionen/Insertionen“, 10 erzeugten ein Stopcodon („nonsense“), 21 waren „missense“ und 2 beeinflussten das Splicing (Tab. 2). Die identifizierten Mutationen waren gleichmäßig auf die 3 VHL-Exone verteilt. So genannte „Loss-of-function-Mutationen“ („Nonsense-“ bzw. „Frame-shift-Mutationen“, [1, 15]) korre-

lierten weder mit dem Differenzierungsgrad noch mit dem Tumorstadium.

Genexpressionsprofile und VHL-Mutationen

Bei der Zuordnung von VHL-Mutationen zu den beiden durch das Hierarchical Clustering generierten Genexpressionsgruppen (Abb. 2) gibt es interessanterweise einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Subtypen. Während in der Gruppe der kNZK 83% (58 von 70) eine VHL-Mutation aufwiesen, hatten nur 25% (3 von 12) der kNZK in der pNZK-Gruppe eine Alteration in der VHL-Gensequenz. Eine SAM-Analyse identifizierte zudem unterschiedlich exprimierte Gene zwischen kNZK mit „VHL-loss-of-function-Mutationen“ und kNZK ohne identifizierte Mutation (Abb. 3). Hier zeigte sich, dass in den VHL-mutierten kNZK vor allem Gene hochreguliert sind, die u. a. in Hypoxie-induzierten Prozessen sowie im Glukosemetabolismus involviert sind (Abb. 4). Beispiele sind CA („carbonic anhydrase IX“), HIG2 („hypoxia-inducible protein 2“) und ANGPTL4 („angiopoietin-like 4“).

Diskussion

Abberationen des VHL-Gens spielen eine zentrale Rolle bei der Entstehung des kNZK. Die Ausgangshypothese der vorliegenden Untersuchung war, dass in Anbetracht der Multifunktionalität von pVHL, verschiedene Mutationen des VHL-Tumorsuppressorgens unterschiedliche Auswirkungen auf das Genexpressionsmuster in kNZK hervorrufen können. In früheren Studien wurden bisher VHL-Mutationsinformationen mit klinischen Parametern, wie Grad, Stadium und Überleben korreliert. Diese Daten sind jedoch äußerst widersprüchlich. Während einige Arbeiten eine VHL-abhängige Prognose postulieren [14, 20], konnten andere Studien keine Assoziation zwischen VHL-Funktion/Mutation und Überleben von kNZK-Patienten erkennen [1, 8]. Es wurden auch Anstrengungen unternommen, um anhand von Genexpressionsanalysen Vorhersagen über den klinischen Ausgang und histologischen Subtyp von NZK-Patienten zu machen. Diese Ansätze sind viel-

versprechend und verdeutlichen die Möglichkeiten von Genexpressionsanalysen in der Pathologie [6]. Studien über den Zusammenhang zwischen *VHL*-Mutationen und Genexpressionsmuster fehlen jedoch bisher in der Literatur.

In einem ersten Ansatz haben wir das Genexpressionsprofil von pNZK und kNZK analysiert, um unsere Daten mit Literaturdaten zu vergleichen. Hierbei zeigte sich eine hohe Konkordanz, was für die Qualität des verwendeten gefrorenen Gewebes und der isolierten RNA spricht. Viele der differenziell regulierten Gene sind in Hypoxie-induzierten Prozessen wie der Angiogenese und dem Glukosestoffwechsel involviert.

NZK-Patienten konnten anhand ihres Genexpressionsprofils in 2 Gruppen aufgeteilt werden. In der einen Gruppe befanden sich nur kNZK, während in die pNZK-Gruppe auch 12 kNZK zugeordnet wurden. Eine zweite Überprüfung dieser 12 kNZK bestätigte die ersten histologischen Befunde. Dies legt die Vermutung nahe, dass sich diese Tumoren zwar phänotypisch von den pNZK abgrenzen, jedoch genotypisch recht ähnlich sind und sich daher *VHL*-unabhängig entwickelten.

Wie frühere Daten zeigten, stellt die Integrität des *VHL*-Tumorsuppressorgens einen wesentlichen Unterschied zwischen beiden Tumorsubtypen dar [12]. Während *VHL* in pNZK praktisch nie verändert vorliegt, ist es in etwa 70% der kNZK mutiert [1], was wir mit unserem kNZK-Kollektiv bestätigen konnten. Ein Vergleich der beiden durch differenzielle Genexpressionsmuster charakterisierten Tumorsubtypen mit den *VHL*-Mutationsdaten zeigte, dass von 12 kNZK in der pNZK-Gruppe nur 3 (25%) eine *VHL*-Mutation aufwiesen. Dagegen fanden sich in 83% der kNZK-Gruppe *VHL*-Mutationen. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass der molekulare Hintergrund von Wildtyp-*VHL*-kNZK dem des pNZK entspricht.

In einem weiteren Schritt haben wir in allen kNZK das Genexpressionsprofil von Tumoren mit Wildtyp-*VHL*- und „*VHL*-loss-of-function-Mutationen“ miteinander verglichen. Knapp 200 Gene wurden zwischen diesen beiden Gruppen differenziell exprimiert. Von diesen Genen sind 14% an *VHL*-regulierten Prozessen

beteiligt, wie z. B. HIF-induzierte (6%) und Mikrotubuli-assoziierte (4%) Prozesse, aber auch Gene, von denen noch nicht bekannt ist, dass sie von p*VHL* kontrolliert werden.

Fazit

Zusammenfassend zeigt diese Untersuchung, dass durch die Kombination von *VHL*-Mutationen und Genexpressionsdaten in kNZK Gene identifiziert werden können, welche durch den Ausfall von p*VHL* dereguliert werden. Dies wird zu einem besseren Verständnis des *VHL*-Signalnetzwerkes führen. Zum anderen werden weitere und verfeinerte Analysen zeigen, welchen Einfluss die verschiedenen Mutationen auf dieses Netzwerk und schlussendlich auf den Krankheitsverlauf von kNZK haben wird.

Korrespondenzadresse

Dr. V.D. Luu
Institut für Klinische Pathologie,
UniversitätsSpital Zürich
Schmelzbergstr. 12, 8091 Zürich
Schweiz
vanduc.luu@usz.ch

Interessenkonflikt. Der korrespondierende Autor gibt an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Literatur

1. Banks RE, Tirukonda P, Taylor C et al. (2006) Genetic and epigenetic analysis of von Hippel-Lindau (*VHL*) gene alterations and relationship with clinical variables in sporadic renal cancer. *Cancer Res* 66: 2000–2011
2. Barry RE, Krek W (2004) The von Hippel-Lindau tumor suppressor: a multi-faceted inhibitor of tumorigenesis. *Trends Mol Med* 10: 466
3. Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA (2004) World health organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of the male urinary system and male genital organs. IARC Press
4. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 14863–14868
5. Gnarr JR, Lerman MI, Zbar B, Linehan WM (1995) Genetics of renal-cell carcinoma and evidence for a critical role for von Hippel-Lindau in renal tumorigenesis. *Semin Oncol* 22: 3–8
6. Hummel M (2007) The impact of gene expression profiling in pathology. *Verh Dtsch Ges Pathol* 91: 160–164
7. Kaelin WG jr (2007) The von hippel-lindau tumor suppressor protein: an update. *Methods Enzymol* 435: 371–383

8. Kim JH, Jung CW, Cho YH et al. (2005) Somatic *VHL* alteration and its impact on prognosis in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Oncol Rep* 13: 859–864
9. Kondo K, Kaelin WG jr (2001) The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. *Exp Cell Res* 264: 117–125
10. Latif F, Tory K, Gnarr J et al. (1993) Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science* 260: 1317–1320
11. Linehan WM, Lerman MI, Zbar B (1995) Identification of the von Hippel-Lindau (*VHL*) gene. Its role in renal cancer. *Jama* 273: 564–570
12. Linehan WM, Walther MM, Zbar B (2003) The genetic basis of cancer of the kidney. *J Urol* 170: 2163–2172
13. Moch H, Gasser T, Amin MB et al. (2000) Prognostic utility of the recently recommended histologic classification and revised TNM staging system of renal cell carcinoma: a swiss experience with 588 tumors. *Cancer* 89: 604–614
14. Patard JJ, Fergelot P, Karakiewicz PI et al. (2008) Low CAIX expression and absence of *VHL* gene mutation are associated with tumor aggressiveness and poor survival of clear cell renal cell carcinoma. *Int J Cancer* 123: 395–400
15. Schraml P, Struckmann K, Hatz F et al. (2002) *VHL* mutations and their correlation with tumour cell proliferation, microvessel density, and patient prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *J Pathol* 196: 186–193
16. Takahashi M, Rhodes DR, Furge KA et al. (2001) Gene expression profiling of clear cell renal cell carcinoma: gene identification and prognostic classification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 9754–9759
17. Takahashi M, Yang XJ, Sugimura J et al. (2003) Molecular subclassification of kidney tumors and the discovery of new diagnostic markers. *Oncogene* 22: 6810–6818
18. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G (2001) Significant analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 5116–5121
19. Wu Z, Irizarry RA, Gentleman R (2004) A model-based background adjustment for oligonucleotide expression arrays. *J Am Stat Assoc* 99: 909–917
20. Yao M, Yoshida M, Kishida T et al. (2002) *VHL* tumor suppressor gene alterations associated with good prognosis in sporadic clear-cell renal carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 94: 1569–1575
21. Zbar B, Brauch H, Talmadge C, Linehan M (1987) Loss of alleles of loci on the short arm of chromosome 3 in renal cell carcinoma. *Nature* 327: 721–724
22. Zhao H, Ljungberg B, Grankvist K et al. (2006) Gene expression profiling predicts survival in conventional renal cell carcinoma. *PLoS Med* 3: e13