A *SMARCB1* gén genetikai és epigenetikai vizsgálata epithelioid sarcomában

Doktori tézisek

Papp Gergő

Semmelweis Egyetem

Patológiai Tudományok Doktori Iskola

Témavezető:	Dr. Sápi Zoltán egyetemi tanár, D.Sc.
Hivatalos bírálók:	Dr. Patócs Attila egyetemi docens, Ph.D.
	Dr. Szőke János főorvos, Ph.D.
Szigorlati bizottság elnöke:	Dr. Schaff Zsuzsa egyetemi tanár, MTA tagja
Szigorlati bizottság tagjai:	Dr. Borka Katalin egyetemi adjunktus, Ph.D.
	Dr. Lazáry Áron tudományos igazgató, Ph.D.

Budapest

2014

1. BEVEZETÉS

A *SMARCB1* (*INI1, hSNF5, BAF47*) klasszikus tumorszupresszor fehérje sejtmagi hiánya alapvetően két neoplázia, a malignus rhabdoid tumor (közel 100%-ban) és az epithelioid sarcoma (körülbelül 90%-ban) karakterisztikus sajátsága. Azonban más lágyrész daganatok, pl. a vese medulláris carcinoma, a myoepithelialis sarcoma, az extraskeletalis myxoid chondrosarcoma és az epithelioid MPNST kisebb százalékos aránya is jellemezhető ezzel a nem funkcionáló fehérjével. A malignus rhabdoid tumorok többségében a SMARCB1 fehérje inaktivitásának hátterében mindig genetikai sérülés (biallélikus deléció és/vagy mutáció) áll, míg az epithelioid sarcoma (és többi daganatféleség) esetén feltehetőleg epigenetikus szabályozás a *SMARCB1* funkcióvesztés oka.

A *SMARCB1* gén kódolja a SWI/SNF ATP-függő kromatin átrendező komplex központi alegységét. Ezen komplex a génexpresszió szabályozására képes azáltal, hogy indukálva a nukleoszóma konformációját az elérhetőbbé válik a transzkripcionális apparátus számára. Úgy tűnik, a SMARCB1 a Rb-cyclin D1 útvonalban szerepelhet, bár a fehérje specifikus funkcióját a különböző daganatok kialakulásában máig nem sikerült tisztázni.

Az epithelioid sarcoma egy ismeretlen patogenezisű, agresszív viselkedésű lágyrész daganat, mely többnyire fiatal felnőtteket érint. Szövettanilag a rhabdoid jelleg gyakran előfordul, főként a proximális típusú epithelioid sarcomában, ezért differenciáldiagnosztikája a malignus rhabdoid tumorral szemben továbbra is nehézségekbe ütközik. Számos közleményben megjelent, hogy az epithelioid sarcoma tumorok mintegy 90%-a immunfenotípusában SMARCB1 negatív. Újabb tanulmányok az epithelioid sarcomák mindössze 10%-ában mutatták ki a SMARCB1 sejtmagi expressziójának hiányát és vele egyetemben a gén biallélikus mutációját és/vagy delécióját. A genetikai eltérések nélküli tumorokban epigenetikai változások vagy poszt-transzkripcionális szabályozások okozhatják a SMARCB1 expressziójának hiányát.

Az epigenetikai szabályozás a DNS metilációján vagy a különböző hiszton modifikációkon (acetiláció, metiláció, foszforiláció, ubikvitináció, stb.) keresztül valósulhat meg. A géncsendesítésben szerepet játszó Polycomb represszor fehérje komplexek, valamint a microRNS-ek (miRNS) is az epigenetikai szabályozás részének tekinthetőek. A DNS metiláció funkciója a kompakt kromoszómaszerkezet kialakítása és a

transzkripció gátlása. Számos sarcoma sejtvonalban és primer tumorban azonosítottak túlzott mértékben metilált, specifikus géneket, beleértve a kulcsfontosságú sejtciklus szabályzó *CDKN2A* gént és másokat. A hiszton metiláció tekintetében a H3K27me3 metiltranszferáz EZH2 (Enhancer of zeste homologue 2) gyakran felülszabályozódik különféle tumorokban például limfómában, de egyes lágyrész sarcomák, pl. synoviális sarcoma esetében is. Az EZH2 overexpressziója korrelációt mutat az előrehaladott daganatos progresszióval, a tumor agresszív viselkedésével és előnytelen klinikai kimenetelével.

A miRNS-ek tumorszupresszorok és protoonkogének poszttranszkripciós gátlásán keresztül szabályozzák a jelátvitel és a sejtciklus folyamatait. Expressziójuk változása a sejtosztódás egyensúlyának felborulásához, fokozott sejtproliferációhoz és daganatképződéshez vezet.

2. CÉLKITŰZÉS

Munkánk során az epithelioid sarcoma kialakulásában szerepet játszó genetikai és epigenetikai tényezők vizsgálatát tűztük ki célul. Azt szerettük volna megállapítani, vajon milyen biológiai mechanizmus állhat a *SMARCB1* tumorszupresszor gén expressziójának eltűnése mögött ebben a daganat típusban.

Főbb kérdéseink, feltételezéseink a következők voltak:

1. A *SMARCB1* gén mutációs státuszának feltárásával arra kerestük a választ, vajon genetikai károsodások (kromoszóma deléciók, exon deléciók, intraexonikus aberrációk) tehetők-e felelőssé a gén funkciójának hiányáért epithelioid sarcomában.

2. Feltételeztük, hogy a *SMARCB1* gén promóterében lévő CpG szigetek hipermetilációja okozhatja a génexpresszió tapasztalt gátlását.

3. Az EZH2 mediálta hiszton metiláció esetleges szerepét az EZH2 és a H3K27me3 epigenetikai marker fehérje expressziójának meghatározásával kívántuk vizsgálni.

4. Feltételeztük, hogy miRNS-ek mint poszttranszkripciós szabályozók felelősek a *SMARCB1* gén csendesítéséért. Ennek kiderítéséhez célul tűztük ki a gén 3'UTR-jét potenciálisan felismerő miRNS-ek azonosítását bioinformatikai módszerekkel. A lehetséges patogenetikai szereppel bíró miRNS-eket miRNS-expressziós vizsgálatokkal kívántuk identifikálni. Az emelkedett expressziót mutató miRNS-ek funkcionális hatását *in vitro* szövettenyészeteken kívántuk vizsgálni.

3. MÓDSZEREK

3.1. Szövetminták, immunhisztokémia

Vizsgálatainkhoz összesen 36 epithelioid sarcomában és két malignus rhabdoid tumorban szenvedő beteg formalinban fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) mintáját használtuk. A SMARCB1 negatív epithelioid sarcoma eseteket immunhisztokémia segítségével válogattuk ki. Az EZH2 expressziót és az EZH2 mediálta H3K27 trimetilációt is immunhisztokémia módszerrel vizsgáltuk.

3.2. *SMARCB1* genetikai vizsgálatok

A Fluoreszcens *In Situ* Hibridizációhoz (FISH) BCR/ABL transzlokációs próbát (Abbott Molecular) használtunk, mivel a BCR próba a teljes 22q11.2 kromoszóma régiót lefedi, beleértve a *BCR* (22q11.23) mellett a *SMARCB1* (22q11.23) gén régióját is. A *SMARCB1* szekvenciák (9 exon) meghatározását a tisztított PCR termékek direkt, mindkét irányból történő szekvenálásával végeztük el.

3.3. Metiláció-specifikus PCR (MSP)

A legalább egy intakt SMARCB1 allélal rendelkező epithelioid sarcomákból izolált DNS minták biszulfit konverzióját követően a *SMARCB1* gén promóter régiójára tervezett metiláció specifikus és nem metiláció specifikus primerekkel végeztük el az MSP vizsgálatot.

3.4. *In silico* miRNS target predikció

A *SMARCB1* gént targetként felismerő miRNS-ek predikciójához a következő öt algoritmust használtuk: MiRBase Target v5, MirTarget2, Targetscan 4.0, RNAhybrid és Pita. A potenciális miRNS-ek közül azokat részesítettük előnyben, amelyet mind az öt program vagy legalább négy előre jelzett.

3.5. *SMARCB1* génexpresszió vizsgálatok

Hét epithelioid sarcoma mintából SMARCB1 immunfestést követően tumorsejteket mikrodisszekáltunk PALM lézer mikrodisszekciós rendszer segítségével. A disszekált sejtekből, a teljes szöveti blokkokból és a miRNS transzfektált sejtekből is RNS-t izoláltunk. Valamennyi minta esetében reverz transzkripciót követő valós-idejű kvantitatív PCR (q-RT-PCR) analízissel, a ΔCT módszert alkalmazva végeztük el a SMARCB1 mRNS-ének mennyiségi meghatározását.

3.6. miRNS expresszió vizsgálatok

A legalább egy intakt *SMARCB1* alléllal rendelkező epithelioid sarcomákon q-RT-PCR módszerrel végeztük el a következő miRNS-ek expressziós analízisét: miR-1, miR-206, miR-381, miR-502, miR-548a, miR-619, miR-671-5p és miR-765.

3.7. Sejtkultúra és miRNS tranziens transzfekció

Két humán tumor (HT-1080 humán fibrosarcoma és Caco-2 humán vastagbél adenocarcinoma sejtvonalak) és egy normál, nem tumoros sejtvonalat (HDFα humán bőr fibroblaszt sejtvonal) tenyésztettünk. A transzfekciós kísérletekhez szükséges miRNS-eket

Pre-miR™ miRNA Precursor molekulák formájában (Ambion) szereztünk be. A sejtvonalakat elektroporációval transzfektáltuk a Neon™ transzfekciós rendszer (Invitrogen) segítségével.

3.8. SMARCB1 fehérje expresszió

A transzfektáns HDFα sejtekben immuncitokémia módszerével vizsgáltuk a *SMARCB1* csendesítés fehérje expresszióra gyakorolt hatását.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Szövettani és immunhisztokémiai vizsgálatok

Az összegyűjtött 36 epithelioid sarcoma közül 20 (az esetek 56%-a) adódott disztális típusúnak, míg a fennmaradó 16 (az esetek 45%-a) proximális típusú volt. SMARCB1 immunhisztokémiával 31 tumor minta (az esetek 86%-a) esetén találtuk a sejtmagi reakció hiányát a daganatsejtekben, míg a tumort infiltráló limfociták, endotélsejtek és környező normál szöveti elemek egyértelműen SMARCB1 pozitívnak mutatkoztak. Az epithelioid sarcoma diagnózist a következő immunhisztokémiai reakciók segítségével állapítottuk meg: diffúz vimentin pozitivitás, legalább fokálisan erős keratin (AE1/AE3) és/vagy EMA pozitivitás, S100 negativitás és SMARCB1 negativitás.

4.2. *SMARCB1* genetikai vizsgálatok

4.2.1. Fluoreszcens in situ hibridizáció

Ha mindkét *SMARCB1* allél deléciót szenvedne el a tumorsejtekben, akkor ezzel magyarázható lenne a SMARCB1 fehérje nukleáris expressziójának hiánya. Azonban mindösszesen négy SMARCB1 negatív epithelioid sarcoma esetében találtunk ún. biallélikus vagyis mindkét *SMARCB1* allélt érintő deléciót. Egyetlen *SMARCB1* allél elvesztése 11 daganat esetében volt kimutatható. A fennmaradó 16 epithelioid sarcomában kromoszómális eltérés FISH reakcióval nem volt detektálható. Poliszómiát, vagyis a kromoszómák többszöröződését összesen öt epithelioid sarcomában találtunk, melyből egy eset triszómiásnak, négy pedig tetraszómiásnak mutatkozott.

4.2.2. A SMARCB1 gén szekvencia analízise

Azoknak az epithelioid sarcomáknak végeztük el a *SMARCB1* gén szekvencia analízisét, amelyekben FISH reakcióval nem volt kimutatható a 22q11.2 kromoszóma régió biallélikus deléciója. Tehát összesen 27 tumorminta *SMARCB1* génjének 9 exonját PCR amplifikáltuk és direkt szekvenáltuk az esetleges mutációk felderítése céljából. Mindössze két epithelioid sarcomában találtunk *SMARCB1* mutációt, az egyik tumorban a gén 5-ös exonjában egy 10 bázispáros duplikációt (ATCCTAGCC), míg a másik daganatban a gén 7-es exonjában egy pontmutációt (GGG>AGG) mutattunk ki. Mindkét szekvencia eltérés olyan tumorban volt, amelyekben FISH reakcióval monoallélikus deléciót találtunk. Így együttvéve a négy esettel, ami biallélikus deléciót mutatott FISH-sel, összességében hat epithelioid sarcomáról mondható el, hogy bennük a *SMARCB1* biallélikus deléciója/mutációja található.

4.2.3. A FISH eredmények validálása

Az alkalmazott FISH próba nagyobb kromoszóma régiót fed át, mint egyetlen gén régiója, ezért előfordulhatott, hogy a kisebb delécióktól meglététől függetlenül a próba a DNS-hez hibridizálni képes. Annak érdekében, hogy ezeknek a kisebb delécióknak (pl. a gén egyes exonjainak teljes deléciói) a lehetőségét kizárjuk és pusztán a tumorsejtek DNS-ét vizsgáljuk, határoztunk a lézer mikrokimetszést követő PCR amplifikáció elvégzése mellett. Ehhez három epithelioid sarcoma esetet választottunk, melyek monoallélikus delécióval bírtak, valamint kettő olyan daganatot, melyek FISH vizsgálata allélvesztést nem mutatott. Mindegyik mikrodisszekált és csak daganatsejteket tartalmazó minta esetében sikeresen sokszoroztuk PCR módszerrel a *SMARCB1* gén 9 exonját. Az exonok meglétét a PCR termékekről készült elektroforetikus gélkép alapján azonosítottuk, ezáltal a biallélikus deléciók előfordulását a tumorsejtekben kizártnak vehettük.

4.3. A *SMARCB1* mRNS expressziós szintjének meghatározása

A *SMARCB1* mRNS szintjének meghatározásához elsőként a teljes szöveti blokkokból izolált epithelioid sarcoma mintákat használtuk. A kvantitatív valós-idejű PCR eredményeként a kontroll májszövethez képest több mint a felére lecsökkent *SMARCB1* expressziót tudtunk kimutatni a mintákban. Feltételeztük, hogy a stróma és más normál sejtek (limfociták, fibroblasztok, endotélsejtek, stb.) jelenléte kontaminációt okozhat a génexpresszió mérése során. Az eltérő normál és tumor szövet arányok következtében kaptuk a különböző *SMARCB1* mRNS szinteket. Emiatt döntöttünk hét, legalább egy intakt *SMARCB1* allélal bíró epithelioid sarcomából tumor és kontroll normál sejtek immunfestést követő mikrodisszekciója mellett. A csupán daganatos sejtek mintáiban *SMARCB1* mRNS expressziót nem detektáltunk, azonban a kontroll sejtekben a *SMARCB1* transzkriptum meglétét igazolni tudtuk.

4.4. *SMARCB1* epigenetikai vizsgálatok

Összességében 25 SMARCB1 negatív epithelioid sarcoma esetén nem találtunk biallélikus genetikai eltérést a *SMARCB1* gént illetően. Ezért az epigenetikai szabályozó folyamatok közül elsőként a *SMARCB1* promóterének metilációját és majd az EZH2 fehérje expressziót és az EZH2 mediálta H3K27 trimetilációt vizsgáltuk meg.

4.4.1. SMARCB1 promóter metiláció

A 25 biszulfit konvertált epithelioid sarcoma DNS-ének metiláció-specifikus PCR (MSP) vizsgálatával azt találtuk, hogy a *SMARCB1* gén promóterében nincsenek metilált citozinok, mivel a PCR-ek során mindegyik daganat esetében kizárólag a nem metiláció specifikus termékek amplifikálódtak.

4.4.2. EZH2 mediálta H3K27 trimetiláció

Az EZH2 immunhisztokémiával megállapítottuk, hogy az EZH2 overexpresszió nem jellemző az epithelioid sarcomára. 25 daganat (69%) bizonyult EZH2 negatívnak, a fennmaradó 11 eset (31%; kilenc proximális és két disztális típus) pedig EZH2 pozitív lett. A H3K27me3 antitest, ami a kizárólag a háromszorosan metilált lizin oldalláncot ismeri fel a H3-as hisztonon szintén negatív immunhisztokémiai reakciót mutatott az összes vizsgált epithelioid sarcoma minta tumorsejtjeiben.

4.4.3. A SMARCB1 mRNS-t célzó miRNS-ek azonosítása

4.4.3.1. In silico target predikció

Az öt target predikciós algoritmussal (lásd Módszerek fejezet) összesen 80 *SMARCB1* specifikus miRNS-t azonosítottunk. Ezek közül egyetlen miRNS-t, a miR-206-ot mindegyik algoritmus jelezte. Hét további miRNS-t (miR-1, miR-381, miR-502, miR-548a, miR-619, miR-671-5p, miR-765) legalább négy program azonosított. A fent konkrétan megnevezett nyolc miRNS-t választottuk ki további kísérleteink végrehajtásához.

4.4.3.2. Target predikciós programokkal kiválasztott miRNS-ek expressziója epithelioid sarcomában

Négy miRNS mutatott szignifikánsan (*p<0,001*) magasabb expressziót a 25 epithelioid sarcoma mintában (melyek legalább egy genetikailag intakt *SMARCB1* alléllal rendelkeztek) összehasonlítva a három kontroll csoport mintáival (két malignus rhabdoid tumor, két SMARCB1 pozitív epithelioid sarcoma és három *SMARCB1* biallélikusan deletált epithelioid sarcoma) és a normál zsírszövettel. A miR-206 5,7-szeres, a miR-381 8,17-szeres, a miR-671-5p 6,55-szörös és a miR-765 10,12-szeres átlagos emelkedését találtuk. A miR-1 és a miR-502 expressziós szintje megegyező vagy lecsökkent értékeket mutatott az összes csoportot tekintve. Ugyanakkor a miR-548a és a miR-619 nem voltak detektálhatóak egyik fent említett szövettípusban sem.

4.4.4. A miRNS-ek hatásának funkcionális vizsgálata sejttenyészetekben

4.4.4.1. A miR-206, miR-381, miR-671-5p és miR-765 géncsendesítés hatása a *SMARCB1* génexpresszióra

Annak igazolására, hogy az epithelioid sarcomában emelkedett expressziót mutató miRNS-ek funkcionálisan képesek szabályozni a *SMARCB1* génátiratok mennyiségét, vagyis csendesíteni tudják ezt a tumorszupresszort, HT-1080, Caco-2 és HDFα sejtvonalakat transzfektáltunk. A HT-1080 sejtekben a miR-206, miR-381 és miR-671-5p által közvetített csendesítés rendre 34,27%-ra, 74,23%-ra és 72,45%-ra csökkentette le szignifikánsan (*p<0,001*) a *SMARCB1* mRNS szintjét 24 óra elteltével. 48 órát követően a miR-206 és a miR-671-5p szignifikánsan csendesítették 54,15%-ra és 74,74%-ra az mRNS szintet, a miR-381-nek nem volt szignifikáns hatása. A miR-206, miR-381 és miR-671-5p transzfekció a Caco-2 sejtekben 43,53%-ra, 79%-ra és 72,45%-ra, a HDFα sejtekben 31,2%-ra, 56,7%-ra és 56,8%-ra redukálta szignifikánsan (*p<0,001* és *p<0,01*) a *SMARCB1* mRNS szintjét. Meglepetésünkre, a miR-765-nek nem találtuk funkcionális hatását a sejtekben, pedig ez a miRNS mutatta a legmagasabb szintű expressziót az epithelioid sarcomákban. A leghatékonyabb géncsendesítő miRNS molekulának a miR-206 bizonyult.

A miR-206/381 és a miR-206/671-5p kombinációk ugyan szignifikánsan (*p<0,001*) csökkentették 44,59%-ra és 35,47%-ra a *SMARCB1* génexpressziót, de a miR-206 általi csendesítés önmagában hatékonyabbnak bizonyult a HDFα sejtvonalban. Vagyis a miRNS-ek szinergisztikus csendesítő funkcióját kísérleti rendszerünkben bizonyítani nem tudtuk.

4.4.4.2. A miR-206, miR-381 és miR-671-5p géncsendesítés hatása a SMARCB1 fehérje expressziójára

Az mRNS szinten leghatékonyabb *SMARCB1* géncsendesítést kiváltó három miRNS (miR-206, miR-381 és miR-671-5p) SMARCB1 fehérjére gyakorolt hatását HDFα sejtek transzfektálásával, majd 24 és 48 óra után a sejteken végzett immuncitokémiával vizsgáltuk. SMARCB1 intranukleáris negativitással rendelkező sejteket a miR-206 transzfektánsok, illetve a miR-206/671-5p és a miR-206/381 ko-transzfektánsok 48 órás kísérletei esetén figyelhettünk meg.

KÖVETKEZTETÉSEK

A dolgozat fő megállapításai a következők:

- Az epithelioid sarcomák többségére (81%) nem jellemező a *SMARCB1* tumorszupresszor gén biallélikus genetikai eltérése. Továbbá sem a gén promóter régiójának hipermetilációja, sem az egyik leggyakoribb hiszton metilációs mechanizmus, az EZH2 mediált H3K27 trimetiláció, sem az *EZH2* gén túlfokozott működése nem felelős a *SMARCB1* transzkripciós gátlásáért.

- A SMARCB1 immunnegatív epithelioid sarcoma tumorsejtekben mRNS expresszió nem kimutatható, ezért poszt-transzlációs módosítások sem okozzák a SMARCB1 fehérje hiányát.

- A *SMARCB1* gén inaktivációjának okaként az RNS interferencia szerepe igazolódott epithelioid sarcomában. Szignifikánsan emelkedett expresszió található a következő négy miRNS esetében: miR-206, miR-381, miR-671-5p és miR-765.

- A miR-206, miR-381 és miR-671-5p, valamint ezen miRNS-ek kombinációi mutatnak funkcionális aktivitást a *SMARCB1* gén csendesítésére.

- A felfedezett epigenetikai szabályozás egy új mechanizmus az epithelioid sarcoma karcinogenezisében: *SMARCB1* tumorszupresszor gént ún. onko-miRNS-ek (miR-206, miR-381, miR-671-5p) szabályozzák, melyek feltehetőleg szerepet játszanak a tumor patogenezisében.

- Eredményeink alapján lehetőség van a malignus rhabdoid tumor és az epithelioid sarcoma (főként a proximális típus) diagnosztikus elkülönítésére.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Az értekezés témájában megjelent közlemények

1. **Papp G**, Krausz T, Stricker TP, Szendrői M, Sápi Z. SMARCB1 expression in epithelioid sarcoma is regulated by miR-206, miR-381, and miR-671-5p on Both mRNA and protein levels. Genes Chromosomes Cancer. 2014, 53(2):168-76.
   IF.: 3,546

2. **Papp G**, Changchien YC, Péterfia B, Pecsenka L, Krausz T, Stricker TP, Khoor A, Donner L, Sápi Z: SMARCB1 protein and mRNA loss is not caused by promoter and histone hypermethylation in epithelioid sarcoma, Mod Pathol 2013, 26(3):393-403.
   IF.: 5,253

Egyéb témában megjelent közlemények

1. Changchien YC, Tátrai P, **Papp G**, Sápi J, Fónyad L, Szendrői M, Pápai Z, Sápi Z: Poorly differentiated synovial sarcoma is associated with high expression of enhancer of zeste homologue 2 (EZH2), J Transl Med 2012, 10:216
   IF.: 3,459

2. Changchien YC, Katalin U, Fillinger J, Fónyad L, **Papp G**, Salamon F, Sápi Z: A challenging case of metastatic intra-abdominal synovial sarcoma with unusual immunophenotype and its differential diagnosis, Case Report Pathol 2012, 2012:786083

3. Changchien YC, Haltrich I, Micsik T, Kiss E, Fónyad L, **Papp G**, Sápi Z: Gonadoblastoma: Case report of two young patients with isochromosome 12p found in the dysgerminoma overgrowth component in one case, Pathol Res Pract 2012, 208:628-632
   IF.: 1,213

4. Balogh Z, Szemlaky Z, Szendrői M, Antal I, Pápai Z, Fónyad L, **Papp G**, Changchien YC, Sápi Z: Correlation between DNA ploidy, metaphase high-resolution comparative genomic hybridization results and clinical outcome of synovial sarcoma, Diagn Pathol 2011, 6:107 **IF.: 1,638**

Előadások, poszterek

1. **Papp G**, Changchien YC, Péterfia B, Sápi Z. A *SMARCB1*/*INI1* gén genetikai és epigenetikai vizsgálata epithelioid sarcomában. (előadás), PhD Tudományos Napok 2012, Budapest, 2012. április 12-13.

2. Changchien YC, Katalin U, Fillinger J, Fónyad L, **Papp G**, Salamon F, Sápi Z. A Challenging Case of Metastatic Intra-abdominal Synovial Sarcoma with Unusual Immunophenotype and Its Differential Diagnosis. (poszter), Technology Transfer in Diagnostic Pathology 7th Central European Regional Meeting, Siófok, 2012. május 15.

3. Changchien YC, Haltrich I, Micsik T, Kiss E, Fónyad L, **Papp G**, Sápi Z. Gonadoblastoma:2 case reports from young patients with gonadal dysgenesis and the molecular approach. (poszter), 2nd Pannonia Congress of Pathology, Siófok, 2012, május 18.

4. **Papp G**, Changchien YC, Péterfia B, Sápi Z. A *SMARCB1* gén genetikai és epigenetikai vizsgálata epithelioid sarcomában. (előadás) - *I. díj*, Fiatal patológusok találkozója (FIPAT 2012), Zamárdi, 2012. szeptember 21-22.

5. **Papp G**, Sápi Z. *SMARCB1* mRNA expression is regulated by microRNAs in epithelioid sarcoma. (előadás), 25th European Congress of Pathology (ECP 2013). Lisbon, Portugal, 2013. augusztus 31-szeptember 4.