

Biomolekulák szerkezetének és kölcsönhatásainak vizsgálata informatikai és tömegspektrometriai módszerek együttes alkalmazásával

A pályázatban elvégzett kutatás fő célja peptidok és proteinek szerkezetvizsgálatára és analizisére szolgáló új tömegspektrometriás lehetőségek kidolgozása volt. Ezt kiegészítette az ezt megalapozó háttér munka elvégzése (pl. elméleti számítások, szofverfejlesztés); a műszeres analitika technikai fejlesztése; valamint az eredmények értelmezését elősegítő informatikai módszerek fejlesztése és alkalmazása. Proteinek analizisét nem-kovalens proteinkomplexek vizsgálatával (ill. az ezt megalapozó fejlesztésekkel) egészítettük ki. Eredményeink az alábbi fő csoportokra oszthatók:

- 1) Peptidek tandem tömegspektrumának értelmezése és ennek alkalmazása peptidek és fehérjék szekvenálására
- 2) Glikopeptidek tandem tömegspektrumának értelmezése és az eredmények analitikai alkalmazása
- 3) Biomolekulák intermolekuláris kölcsönhatásainak, szupramolekuláris komplexeinek vizsgálata
- 4) A tandem tömegspektrometriában használatos műszeres technikák elméleti leírása és fejlesztése
- 5) Tömegspektrumok leírását és automatikus értelmezését segítő informatikai módszerek fejlesztése és alkalmazása

A fenti csoportosítás az elvégzett feladatot célirányosan mutatja, a jobb érthetőség kedvéért az eredményeket nem időrendbeli sorrendben ismertetjük. Az elvégzett munka néhány kivételtől eltekintve megfelel a pályázatban vállaltaknak. A biomolekulák intermolekuláris kölcsönhatásainak vizsgálata témakört a tervezetthez képest kevesebb eredménnyel fejeztük be. A megalapozó vizsgálatokat ugyan sikerrel elvégeztük, de a tervezett együttműködések elmaradása miatt nem tudtuk megfelelően befejezni. A peptidfragmentáció sikeres leírását követően munkánkat glikopeptidek analizise irányába, a tervezetthez képest jelentősen bővítettük. Ennek oka, hogy ez a kutatási terület igen gyorsan fejlődik, az itt elért siker nagy érdeklődésre tart számot, melyet publikációk sora bizonyít. További eltérés, hogy a pályázatban a tandem tömegspektrometriai vizsgálatát elsősorban ioncsapda és quadropól (ill. Q-TOF) készülékeken terveztük. Ezt elvégeztük, de a feladatot Fourier-transzformációs tömegspektrometria irányába kibővítettük. Ennek elsődleges oka, hogy ez a készüléktípus egyre nagyobb jelentőségre tesz.

1) *Peptidek tandem tömegspektrumának értelmezése és ennek alkalmazása peptidek és fehérjék szekvenálására.*

A proteomika a modern biokémia egyik legfontosabb irányvonala; ezen terület egyik legfontosabb analitikai eszköze a tömegspektrometria. Proteinek azonosítása és szekvenálása elsősorban az ezekből enzimessal előállított peptidok tandem tömegspektrometriáján alapul. Ennek során a kiválasztott peptid fragmentálódik. A spektrum értelmezése révén meg lehet határozni a peptid szekvenciáját. Ha meghatározzuk az összes lehetséges peptid aminosavsorrendjét, a protein szekvenciája is meghatározható. A gyakorlatban a protein azonosítása akkor is elvégezhető, ha töredékes információ áll a rendelkezésünkre. A feladat megoldása rendkívül időigényes, ma már

nagymértékben automatizált. A proteinszekvenálás kulcskérdése a tömegspektrum és a peptid szerkezete (szekvenciája) közötti összefüggés; mely ma sem ismert kellő részletességgel. Ennek ismerete azért fontos, mert a proteomikai kutatások alkalmazhatóságát a peptidfragmentáció pontosabb ismerete nagymértékben növelné.

Részletesen megvizsgáltunk mintegy 200, szintetikusan erre a célra előállított modell-peptid fragmentációját. Az ütközési energia függvényében felvettük, majd értelmeztük ezek tandem tömegspektrumát. A korábban általunk kidolgozott MassKinetics reakciókinetikai program segítségével **modelleztük a peptidek tandem tömegspektrumát**. Speciális optimalizáló programot fejlesztettünk ki, mely lehetővé teszi sokszáz paraméter együttes optimalizálását. Megállapítottuk, hogy a spektrumok viszonylag kis számú empirikus paraméter (pl. lokális protonaffinitás, energiakonverzió, stb.) segítségével jól leírhatók. Ami ennél sokkal fontosabb, ugyanezek az optimált paraméterek peptidek fragmentációjának előrejelzésére is alkalmazhatók. A peptidszekvencia és a kísérleti paraméterek ismeretében a kidolgozott szoftver jó közelítéssel meg tudja határozni a tandem tömegspektrumot. A pontosság a „hasonlósági paraméterrel” (SI) jól jellemezhető. Mintegy 20 empirikus paraméter segítségével az SI értéke mintegy 0.5; 50 paraméter alkalmazása esetén ez ca. 0,75-re nő. (megjegyzem, hogy a jelenleg használatos keresőrendszerek – pl. Mascot – esetén ez a hasonlóság mindössze 0.1). A kidolgozott peptidfragmentációs modell (és program) igen nagy jelentőségű, komoly gyakorlati alkalmazása lehet. Az eredményeket csak részben publikáltuk [3], mivel ipari/kereskedelmi partnert keresünk az eredmények felhasználására. Az érdemi publikáció sajnos szabadalmi okok miatt csak később lehetséges.

A projekt során elért (és publikált) **egyik legfontosabb eredmény a leucin enkefalin tandem tömegspektrometriájának összefoglaló leírása** [13]. Ez a pentapeptid a tömegspektrometriában leggyakrabban alkalmazott és legrészletesebben vizsgált referensvegyület, melynek fragmentációját több mint 100 cikkben vizsgálták. Leírtuk a protonált leucin enkefalin legfontosabb reakcióútjait. A legkisebb aktiválási energiát igénylő, egyúttal számos ok miatt legfontosabb fragmentációs folyamat az ú.n. b4 ion képződése a protonált molekulából. Megállapítottuk, hogy ennek a reakciónak az aktiválási energiája 1.14 ± 0.05 eV. Mivel peptidek aktiválási energiái alig ismertek, ez az érték kulcsfontosságú lesz az elkövetkező időszakban; más peptidek esetén referenciaértékként szolgálhat. Összehasonlítottuk a különböző készüléktípusokon és változó kísérleti körülmények között felvett spektrumokat. Megállapítottuk, hogy az 50% „survival yield”-nek (SY) megfelelő spektrumok jól reprodukálhatók és jól értelmezhetők. Ez az optimális beállítás nehezen értelmezhető spektrumok megfejtésére, ill. akkor, ha a reprodukálhatóság az elsődleges szempont. A nagyobb ütközési energián felvett spektrumok (SY25, SY10) esetén nagy energiaigényű, valamint konsekutív reakciósorozatban képződő fragmensek is észlelhetők. Ezek a spektrumok nehezebben értelmezhetők, de ugyanakkor nagyobb információ tartalommal rendelkeznek.

Peptidek tandem tömegspektrometriájának másik fontos kérdése, hogy a spektrumokat milyen kísérleti körülmények között vesszük fel. A legfontosabb paraméter az ütközési energia. Kis ütközési energia esetén nincs fragmentáció; túl nagy energia használata a molekula túlzott töredezését eredményezi, és hiányoznak a szekvencia meghatározásához

szükséges fragmensek. A szekvencia sikeres meghatározásához csak egy szűk energiatarományban felvett spektrumok értékelhetők sikeresen. Szintetikus peptidok vizsgálata esetén van lehetőség ennek az ütközési energia optimalizálására. Proteomikai vizsgálatok során azonban idő és minta hiányában nincs lehetőség optimalizálásra, a HPLC futás során automatikusan kell meghatározni az alkalmazott ütközési energiát. Részben ennek következtében a használt HPLC-MS-MS protokollok során a felvett tandem tömegspektrumok csak kis része (mindössze 5-10%-a!) értékelhető. Egy adott vegyületre vonatkozó „ideális” ütközési energia számos paramétertől függ, de ezek közül a legfontosabb a molekulatömeg.

Az optimális ütközési energia molekulatömegtől való változását [12] polietilén-glikol polimer rendszeren tanulmányoztuk, a 200-4000 Da tömegtartományban. Az „optimális” ütközési energiának azt választottuk, mely 50% SY értéket eredményez. A világon elsőként megállapítottuk, hogy ez az ütközési energia a molekulatömeggel igen jó lineáris összefüggésben van. Mivel polimer rendszerénél a fragmentációt meghatározó más paraméterek (pl. aktiválási energia, energiáttranszfer, stb.) a molekulatömegtől nem (vagy csak igen kis mértékben) változnak; az kimutatott lineáris korreláció igen jó közelítés, az ezt jellemző R^2 érték ca. 0,996. Megállapítottuk továbbá, hogy az egyszeresen és többszörösen töltött ionok ugyanazzal az egyenessel írhatók le (vagyis ez az összefüggés a töltésszámtól független). A vizsgálatokat hármass kvadrupól, Q-TOF és ionsapda készülékek esetén is megvizsgáltuk. Mindhárom esetben ugyanazt az összefüggést mutattuk ki, vagyis megállapításaink az alkalmazott készüléktípustól függetlennek bizonyultak. Vizsgálatainkat több más polimer rendszeren is elvégeztük, hasonló eredménnyel. Számos peptidet is megvizsgáltunk. Megállapítottuk, hogy peptidok esetén hasonló lineáris összefüggés mutatkozik, de (1) az egyenes meredeksége a polimerektől lényegesen eltér (azaz sokkal kisebb energia szükséges peptidok, mint polimerek fragmentálásához); (2) az adatpontok szórása nagyobb, mint ami a polimereknél észlelhető. Ez utóbbi oka feltehetőleg az egyes peptidok kémiai tulajdonságai közötti eltérés.

Kutatásainkat a peptidok esetén észlelt „szórás” értelmezése irányában folytattuk. Ezek a vizsgálatok folyamatban vannak [12]. Előzetes eredményeink azt mutatják, hogy peptidok esetén (a polimer rendszerekkel ellentétben) a töltésszám és a peptidokban előforduló erősen bázikus aminosavak száma alapvetően befolyásolja a fragmentációs tulajdonságokat. A méretfüggés esetén észlelt „szórás” ennek eredménye. Eredményeink alapján a jelenleg elfogadottnál sokkal hatékonyabb algoritmusokat lehet (és célszerű) alkalmazni a (proteomikában tipikusan alkalmazott) HPLC-MS-MS mérések esetén az ütközési energia automatikus meghatározására.

A peptidfragmentáció értelmezésében kapott eredményeinket gyakorlati munkánkban is alkalmaztuk, különböző peptidok, fehérjék szerkezetvizsgálatára és analitikájára. Megvizsgáltuk hogy peptidok energiafüggésének ismerete milyen mértékben alkalmazható intakt proteinek szerkezetvizsgálatára [1,15,17]. Eredményeinket alkalmaztuk proteinek, glikoproteinek analitikai vizsgálatára, valamint analitikai módszerfejlesztések elősegítésére [2,6,9].

2) *Glikopeptidek tandem tömegspektrumának értelmezése és az eredmények analitikai alkalmazása*

Peptidekkel kapcsolatos, korábban ismertett eredményeink arra utalnak, hogy az energiafüggés ismerete az általánosan elfogadottnál lényegesen fontosabb a sikeres szerkezetvizsgálat érdekében. Sikereinken felbuzdulva kutatásainkat glikopeptidek vizsgálata irányába bővítettük. A glikoziláció vizsgálata gyorsan fejlődő terület, jelentős számú, nagyrészt megoldatlan analitikai problémával. Ezen belül, glikopeptidek szerkezetmeghatározása sem megoldott.

Kutatásaink során megállapítottuk, hogy ***glikopeptidek esetén (peptidekhez képest) sokkal kisebb ütközési energia alkalmazása célszerű.*** Amennyiben a proteomikában szokásos protokollokat alkalmazzuk (és az irodalomban vizsgált példák esetén ez történt), a glikopeptid túlzott mértékben fragmentálódik. Ennek két súlyos következménye, hogy megakadályozza a cukorszekvenca meghatározását, valamint hamis eredményt ad a glikozilációs mintázatról. [6,14]

Az energiafüggés vizsgálatával, valamint a szokásosnál sokkal alacsonyabb „cone” feszültség alkalmazásával sikerrel értelmeztük glikopeptidek fragmentációs folyamatait. Az eredményeket két irányban is hasznosítottuk: Egyrészt, gyakorlati, glikoproteomikai feladatok megoldására; másrészt a glikoziláció automatikus értelmezésére és a glikozilációs mintázat meghatározására szolgáló algoritmus kifejlesztésére. Ez utóbbit az 5) fejezetben, az informatikai fejlesztéseink tárgyalásakor ismertetjük részletesen. [6,14]

3) *Biomolekulák intermolekuláris kölcsönhatásainak, szupramolekuláris komplexeinek vizsgálata* [15,17]

Biomolekulák kölcsönhatásainak vizsgálata során, a terveknek megfelelően, elsőként tiokallixarének fémionokkal alkotott komplexeinek stabilitását vizsgáltuk a tömegspektrometria eszköztárával. Módszert dolgoztunk ki arra, hogy a tömegspektrumban észlelt iontenzitásokat, ill. intenzitásarányokat felhasználva egyensúlyi állandókat határozzunk meg. Az így kapott egyensúlyi állandókat „látszólagos” (apparent) állandónak kell tekinteni, mivel nem egyensúlyi rendszerben lettek meghatározva. Irodalmi adatok alapján az így meghatározott értékek kvalitatíve jól jellemzik az egyes komplexek relatív stabilitását. Kompetitív komplexképzési folyamatokat vizsgálva megállapítottuk, hogy adott kallixarének mely alkálifémekkel képeznek stabil komplexet; ill. azt hogy adott fémionnal mely kallixarénnel képez stabil komplexet. A tömegspektrométerben, gázfázisban mért látszólagos egyensúlyi (ill. stabilitási) állandókat összehasonlítottuk az oldatfázisban mért affinitásokkal. A gázfázisú és folyadékfázisú eredmények között jó korrelációt sikerült kimutatnunk. Ezek az eredmények Pollreisz Ferenc 2008-ban benyújtott (és sikeresen megvédett) doktori dolgozatának részét képezték.

Makromolekuláris komplexek stabilitását angol együttműködésben vizsgáltuk. Olyan elméleti modellt dolgoztunk ki, mely jól leírja ezen komplexek töltéseloszlását, valamint

tandem tömegspektrometriai jellemzőit. A modell segítségével sikeresen értelmeztük ezen komplexek ún. aszimmetrikus hasadását.

Enzim szubsztrát kölcsönhatások vizsgálata során speciális tömegspektrometria módszert dolgoztunk ki ezen makromolekuláris komplexek ESI ionizációval történő vizsgálatára. Megállapítottuk, hogy fiziológias körülmények között ilyen komplexek jól észlelhetők; tandem tömegspektrometria segítségével pedig stabilitásuk is jól jellemezhető. (Szokásos körülmények esetén az ESI tömegspektrometriát savas, sómentes közegben, jelentős mennyiségű szerves oldószer jelenlétében végezzük. Ez elősegíti az ionképződést, javítja az érzékenységet és a felbontást, azonban a fiziológias körülmények között létező nem-kovalens komplexek ilyen esetben gyakran elbomlanak. Az ESI ionizáció esetén „fiziológias” körülmények csak minimális szerves oldószert (pl. 10% metanolt) tartalmazó vizes közeget, semleges pH-t és jelentős (ca. 100 mM) sókoncentrációt igényelnek. Ilyen esetben a vizes fázisban meglévő nem-kovalens makromolekuláris komplexek bomlás nélkül jutnak a tömegspektrométerbe, ahol intenzitásuk, esetleg tandem tömegspektrometriai tulajdonságaik alapján jól vizsgálhatók.) Az ELTE-vel (Prof. Gráf L.) együttműködésben vizsgáltuk marha- és kecskerák-tripszin marha-tripszin inhibitorral képzett komplexét. Megállapítottuk, hogy az oldatfázisú mérésekkel összhangban, a kecskerák tripszin a marha-tripszin inhibitorral rendkívül stabil komplexet képez. [15]

4) A tandem tömegspektrometriában használatos műszeres technikák elméleti leírása és fejlesztése

Az új ionizációs lehetőségek, ill. a műszertechnikai fejlesztések lehetővé tették a tandem tömegspektrometria (MS/MS) szélesebb körű elterjedését, amely a vizsgált vegyületről a korábbinál sokkal részletesebb információt szolgáltat. A hagyományos tömegspektrometriás kísérletek esetén az ionizációt követően az ionforrásban képződő ionokat „azonnal” tömeg szerint elválasztjuk és detektáljuk. Tandem tömegspektrometria esetén az ionizációt követően kiválasztjuk azt az iont, amelynek szerkezetét meg akarjuk határozni és ezt az iont gerjesztjük/fragmentáltatjuk. Az így nyert fragmenseket m/z értékük szerint szétválasztjuk. A tandem tömegspektrometriás vizsgálatok során két azonos vagy különböző analízátort használunk, melyek között ütközési cella található a fragmentáció elősegítésére. Ily módon lehetőség van a tömegspektrumban észlelt minden egyes ionról újabb tömegspektrum felvételére, és ennek segítségével egy ionnak nem csak a tömegéről, hanem szerkezetéről is információt kaphatunk.

A proteomikában a tandem tömegspektrometria alapvető eszközzé vált, a proteomikai folyóiratok tömegspektrometrias fehérje azonosítást tandem tömegspektrometria alkalmazása ma már nélkül nem fogadnak el. Azonban a peptidek tömegspektrometriás fragmentációjának leírására nem létezik olyan modell, amely jól előrejelezné a spektrumokat. Ezért olyan fizikai-kémiai modellt dolgoztunk ki, amely képes a peptidek tandem tömegspektrumának pontos - az ionok intenzitását is tartalmazó - előrejelzésére. A modell fejlesztéséhez több száz peptidről vettünk fel tandem tömegspektrumot hármaskvadrupól (QQQ) és ioncsapda típusú tömegspektrométereken. A modell peptidfragmentációt leíró részét az 1) fejezetben ismertettük. A modell második fő egysége a QQQ, Q-TOF ill. ion-csapda készülékek leírása, melyet sikerrel megoldottunk.

Miután sikeresen modelleztük a QQQ és ioncsapda készülékeket, egy bonyolultabb készülék irányába léptünk tovább. A Fourier transzformációs tömegspektrometria egyre nagyobb szerepet tölt be a mindennapjainkban. Munkánk során e különleges technika sajátosságait vizsgáltuk, rávilágítottunk arra, hogy az ionok IR fotonemissziója (az IR hűlés) igen fontos az ún. nem rezonáns gerjesztésű ütközéses aktiválás (sustained off-resonance irradiation collision induced dissociation, SORI-CID) kísérletek során. A SORI gerjesztési kísérletek során az ion-ciklotron (ICR) cellában a körpályán keringő ionokat a keringési frekvenciától eltérő rádiófrekvenciás gerjesztéssel periodikusan gyorsítják, illetve lassítják, amelyek így az ütközőgáz (jelen esetben argon) részecskéivel való ütközések során magasabb belső energiára tesznek szert.

Vizsgálataink során egy öttagú peptid – a leucin-enkefalin – fragmentációját modelleztük argon ütköző gáz jelenlétében. A nagyszámú ütközés modellezésére egy új stratégiát dolgozunk ki, ami jelentősen lerövidíti a modellezéshez szükséges időt [4]. **A hőmérséklet, kinetikus energia és idő függvényében felvett kísérleti adatkészletből az infravörös hűlés és az energia-átadás hatékonyságának mértékét határoztuk meg, amely 12.8%-nak ill. 7.4 s⁻¹-nek adódott [4].** A két vizsgált paraméter – az energia-átadás hatékonysága és az infravörös hűlés sebessége – vizsgálatkor bebizonyosodott, hogy a két folyamat egymástól nem választható el, a paraméterek számos kombinációja elfogadható illeszkedést ad a szimulált és a mért adatok között.

5) Tömegspektrumok leírását és automatikus értelmezését segítő informatikai módszerek fejlesztése és alkalmazása

A korábbiakban részletesen tárgyalt modellezések és kísérleti eredmények segítségével sikeresen leírtuk ill. értelmeztük a tömegspektrométerben lejátszódó folyamatokat. Ezen túlmenően, a fenti információk arra is lehetőséget nyújtanak, hogy a tömegspektrumok értelmezését, értékelését segítő - a napi gyakorlatban is felhasználható – informatikai módszereket fejlesszünk.

A részletesen vizsgált glikopeptidek fragmentációjából ill. tömegspektrometria általános működéséről nyert információkat felhasználva egy új algoritmust és számítógépes programot dolgoztunk ki, amely képes a glikopeptidek tandem tömegspektrumának automatikusan értékelésére. A program először felismeri a több ezer spektrumból, hogy mely spektrumok lehetnek glikopeptidek. Ezt követően meghatározza mind a peptid, mind pedig a glikán összetételt. Fontos tulajdonsága a programnak, hogy alacsony ‘álpozitív/negatív’ aránnyal dolgozik. Tapasztalatunk szerint ez kevesebb mint 0,1% (csak rossz minőségű spektrumok esetén „hibázik” az algoritmus) [5,7,8]

A program a következő szempontokat és molekuláris jellemzőket veszi figyelembe működése során:

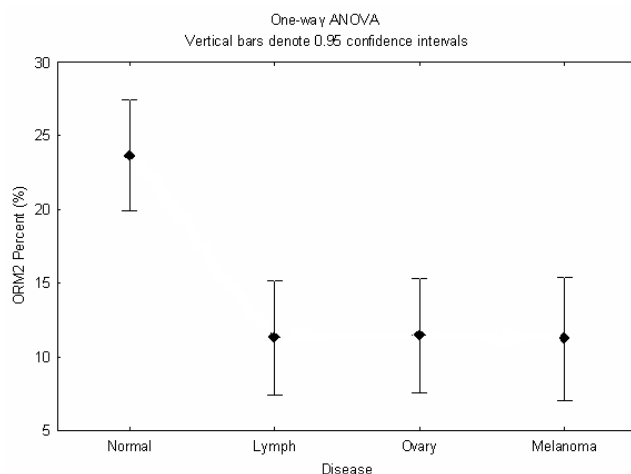
- 1) Egyszeres töltésű oligoszaccharid fragmensek (ún. oxónium ionok) jelenléte és intenzitása.
- 2) Jellegzetes oligoszacharid tömegkülönbségek nagyobb tömegtartományban
- 3) Peptidlánc lehetséges tömege (a konzervatív oligoszacharid szerkezet fragmentációjából meghatározva)
- 4) Spektrum minősége
- 5) Lehetséges peptidszerkezetek a molekulatömeg alapján
- 6) A mérés tömegpontossága

A kidolgozott program windows alatt fut, és a honlapunkról letölthető.

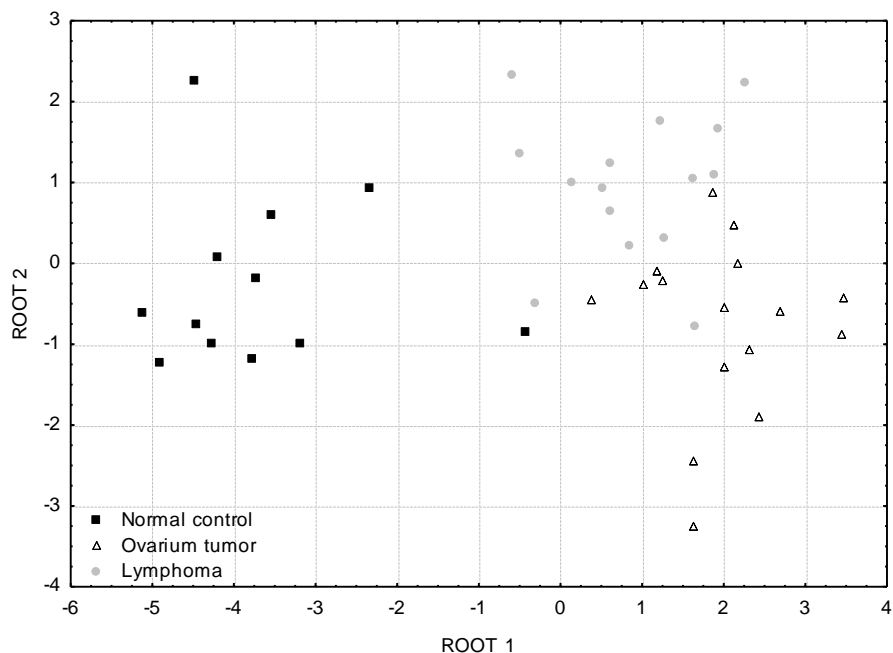
<http://www.chemres.hu/ms/glycominer/index.php>

A kidolgozott programot enzimatikusan emésztett glikoproteinek HPLC-MS/MS spektrumának értékelésére használtuk fel. Segítségével a glikozilációs mintázatban látható eltérések azonosítók (azaz megállapítható, hogy az adott retenciós időnél milyen glikopeptidek eluálódnak) .

Az alfa-1-savas glikoprotein esetén vizsgáltuk, hogy az alfa-1-savas glikoprotein genetikai variánsaink aránya hogyan változik meg a patofiziológias állapot változására. nano-HPLC-MS-MS technika felhasználásával meghatároztuk ORM1 és ORM2 genetikai variánsok arányát limfómás, ovárium tumoros, bőrrákban szenvedő betegek és egészséges kontroll esetén. Az eredmények kiértékeléséhez One-Way ANOVA többváltozós statisztikai technikát alkalmaztuk. Az eredmények azt mutatják, hogy ORM1 genetikai variáns aránya megnő a rákos betegségben szenvedők esetén a kontroll csoport összehasonlításában [9,16].



A program segítségével sikeresen azonosítottuk 34 oligoszaccharid szerkezetet. 43 egyedi vérmintán (egészséges kontroll, limfómában és ovárium tumorban szenvedő betegek esetén) vizsgáltuk, hogy a cukrok szerkezete hogyan változik meg. A korábban irodalomban alkalmazott ún. fukozilációs index nem adott megfelelő elválasztást, ezért új, lineáris diszkriminancia analízisen alapuló módszert dolgoztunk ki. A módszer a 3 csoport között 88%-os klasszifikációt ad. A módszer validálása azt igazolta, hogy a módszer alkalmas a rákos megbetegedések előrejelzésére (96% szelektivitással és 93%-os specificitással) [10] Az alábbi ábrán látható a 3 csoport megkülönböztetése LDA technikával:



Referenciák:

1. Ferenc Pollreisz, Tímea Imre, Gitta Schlosser, Pál Szabó, Károly Vékey, Gabriella Pocsfalvi: Fragmentation behavior of intact proteins on a Q-TOF type instrument, 24th Informal Meeting on Mass Spectrometry, Ustron, Lengyelország, 2006
2. Judit Krenyacz, Laszlo Drahos, Zoltan Takats, Karoly Vekey: Protein Quantitation in Biological Samples - an Alternative of ELISA, 17th International Mass Spectrometry Conference, Prague/Czech Republic, Aug 27 – Sep 1, 2006 ThP-262, 2006
3. Karoly Vekey: Theoretical Modelling of Mass Spectrometric Reactions, 23th French Mass Spectrometry Conference, Plenary lecture, Szept. 11-14, Nantes, France page: 25, 2006
4. Csaba Peltz, László Drahos and Károly Vékey: SORI Excitation: Collisional and Radiative Processes, J. Am Soc. Mass Spectrom, doi:10.1016/j.jasms.2007.09.011, 2007
5. O. Ozohanics, J. Krenyácz, F. Pollreisz, K. Vékey, L. Drahos: Automatic identification of saccharides and glycopeptides in MS/MS spectra, 25th Informal Meeting on Mass Spectrometry, 6th – 10 th May, Nyíregyháza-Sóstó, Hungary, 2007
6. Judit Krenyácz, László Drahos and Károly Vékey: FRAGMENTATION OF GLYCOPEPTIDES: MECHANISM AND ENERGY DEPENDENCE, 26th Informal Meeting on Mass Spectrometry, Fiera di Primiero, Olaszország, 2008
7. Olivér Ozohanics, Judit Krenyacz, Ferenc Pollreisz, Krisztina Ludányi, Károly Vékey, László Drahos: GlycoMiner: A new software tool to elucidate glycopeptide

composition, 2nd Central and Eastern European Proteomics Conference, Jéna, Németország, 2008

8. Oliver Ozohanics, Judit Krenyacz, Krisztina Ludányi, Ferenc Pollreisz, Károly Vékey, László Drahos: GlycoMiner: a new software tool to elucidate glycopeptide composition, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, Volume 22, 3245, 2008
9. Oliver Ozohanics, Judit Krenyacz, Livia Budai, Krisztina Ludányi, Tibor Kremmer, Károly Vékey, László Drahos: ANALYSIS OF GENETIC VARIANTS OF α -1 ACID GLYCOPROTEIN IN CANCER, 26th Informal Meeting on Mass Spectrometry, Fiera di Primiero, Olaszország, 2008
10. Tímea Imre, Tibor Kremmer, Károly Héberger, Éva Molnár-Szöllősi, Krisztina Ludányi, Gabriella Pócsfalvi, Antonio Malorni, László Drahos, Károly Vékey: Mass spectrometric and linear discriminant analysis of N-glycans of human serum alpha-1-acid glycoprotein in cancer patients and healthy individuals, *J. Proteomics*, 71, 181, 2008
11. Livia Budai, Oliver Ozohanics, Krisztina Ludányi, László Drahos, Tibor Kremmer, Judit Krenyacz, Károly Vékey, Investigation of genetic variants of α -1 acid glycoprotein by ultra-performance liquid chromatography–mass spectrometry, *Anal Bioanal Chem* (2009) 393:991–998
12. Memboeuf A, Nasioudis A, Indelicato S, Pollreisz F, Kuki A, Keki S, van den Brink OF, Vekey K, Drahos L, Size effect on fragmentation in tandem mass spectrometry., *Anal. Chem.* 82:(6) pp. 2294-2302. (2010)
13. Judit Sztáray, Antony Memboeuf, László Drahos, Károly Vékey, Leucine Enkephanyl – a mass spectrometry standard, *Mass Spectrometry Reviews*, megjelenés alatt
14. Judit Krenyacz, László Drahos and Károly Vékey: Collision energy and cone voltage optimisation for glycopeptide analysis, *European Journal of Mass Spectrometry*, Volume 15 Issue doi: 10.1255/ejms.942, 2009
15. Oliver Ozohanics, Ferenc Pollreisz, László Gráf, Károly Vékey: Intact protein analysis of crayfish trypsin variants, 27th Informal Meeting on Mass Spectrometry, Retz, Austria
16. Oliver Ozohanics, László Drahos, Károly Vékey, Glycosylation, mass spectrometry and informatics, 3rd Central and Eastern European Proteomics Conference, Budapest, 2009
17. Pollreisz Ferenc, Molekuláris komplexek tömegspektometriás vizsgálata, *Doktori Értekezés* (2008)