



BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM  
VEGYÉSZMÉRNÖKI ÉS BIOMÉRNÖKI KAR  
OLÁH GYÖRGY DOKTORI ISKOLA

*Ph.D. Értekezés Tézisei*

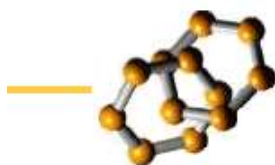
# Fehérjék nemkovalens komplexképzésének és glikozilációjának tömegspektrometriás vizsgálata

**Imre Tímea**

Témavezető: Dr. Szabó Pál Tamás

Készült:

Magyar Tudományos Akadémia Kémiai Kutatóközpont,  
Szerkezeti Kémia Intézet, Tömegspektrometria Osztály



**Kémiai Kutatóközpont**  
Magyar Tudományos Akadémia  
CENTER OF EXCELLENCE

2009.

## I. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉS

Napjainkban egyre nagyobb erőfeszítéseket tesznek az élő szerkezeteket felépítő biomolekulák (szénhidrátok, peptidek, fehérjék glikoproteinek, nukleinsavak) szerkezetének felderítésére, illetve a szerkezetben különböző hatásokra (pl. betegségek) bekövetkező változásoknak a tanulmányozására. A szerkezet pontos ismerete segíthet a bonyolult biokémiai folyamatok megértésében; a szerkezetben bekövetkező változások időben történő felismerése pedig orvosi, diagnosztikai jelentőséggel bír.

A proteomikai vizsgálatokban alapvető szerepe van a modern bioanalitikai és szerkezetkutató eszközöknek, amelyek közül a tömegspektrometria a legelterjedtebb és legsokoldalúbban alkalmazott módszer biokémiai és biológiai feladatok megoldásához. Ilyen irányú alkalmazását a lágy ionizációs módszerek (ESI és MALDI) kifejlesztése forradalmasította, lehetővé téve makromolekulák (elsősorban proteinek) és komplex keverékek (így például vér, vizelet) vizsgálatát.

A proteinek, peptidek, nukleinsavak a legtöbb biokémiai folyamatban egymással illetve egyéb kis molekulatömegű ligandumokkal kölcsönhatásban vesznek részt. Nemkovalens kölcsönhatások tanulmányozása az elmúlt évtizedekben kezdődött, és mára a proteomikai kutatások egyik legfontosabb területét teszi ki. A nemkovalens komplexek szerkezetvizsgálatában a legfontosabb szempont, hogy az analízis során a gyenge kötések végig megmaradjanak. Az eddig elterjedt NMR-, IR-, Raman-, CD-spektroszkópia, valamint röntgendiffrakciós szerkezetvizsgálati módszerek mellett a tömegspektrometriának igen nagy szerep jutott ezen a területen is. Egy egyszerű tömegspektrum már információt adhat a komplex molekulatömegéről és a sztöchiometriáról.

A proteomika fontos kutatási területe továbbá a fehérjék transzláció utáni módosulásainak vizsgálata. Ezen folyamatok közül a glikoziláció az egyik legismertebb poszt-transzlációs módosítás, amely során a szénhidrát rész szabályozott beépülése történik, jelentős funkcióváltozást okozva. A glikoziláció iránti figyelem köszönhető annak is, hogy az oligoszacharidok jelenlétét, ill. szerkezeti és mennyiségbeli változását megfigyelték különböző patofiziológiai állapotokban, mint pl. tumoros megbetegedések, reumás artritisz, immunhiányos betegségek esetében. A modern elválasztástechnikákkal kombinált tömegspektrometria jelenleg a legsokoldalúbb és leghatékonyabb analitikai eszköz proteinek glikozilációjának és a szénhidrátok szerkezetének felderítésére.

Doktori munkámban célul tűztem ki fehérjék, glikoproteinek szerkezetének, mikroheterogenitásának tanulmányozását, fehérje-ligandum kölcsönhatások illetve fehérjék kötőhelyének vizsgálatát különböző tömegspektrometriás technikákat alkalmazva. A terjedelmes témán belül a disszertációmban két (a lipokalinok családjába tartozó) fehérje szerkezetvizsgálatát mutatom be, amelyekhez terveztük:

a) a lipokalin béta-laktoglobulin (BLG) és egy többszörösen telítetlen zsírsav, a *cis*-parinásav (cPA) nemkovalens komplexének igazolását. Vizsgálni kívántuk a kötés specifikusságát, amihez kompetitív kötődési kísérleteket terveztünk. Célunk volt még a protein ligandumkötő helyének tömegspektrometriás tanulmányozása, amelyhez a molekula limitált proteolízisét hajtottuk végre.

b) olyan új analitikai módszer kidolgozását, amellyel a rendkívül heterogén humán szérum  $\alpha$ -1 savas glikoprotein (AGP) glikozilációs hely szerinti oligoszacharid eloszlását vizsgálhatjuk.

c) különböző tumoros betegekből és egészséges kontroll mintákból származó AGP oligoszacharidok MALDI-MS tömegspektrometriás analízisét, abból a célból, hogy a betegség okozta szerkezetbeli változásokat feltérképezzük. Eredményeinket kemometriai módszerrel értékeltük ki.

## II. KÍSÉRLETI MÓDSZEREK

A BLG-cPA komplex, valamint a fehérje ligandumkötő helyét tartalmazó fragmentum tömegspektrometriás vizsgálata egy Perkin Elmer Sciex API 2000 (Toronto, Kanada) típusú turboionspray ionforrással felszerelt hármass kvadrupól készüléken, pozitív ionizációs módban történt.

Az AGP kapcsolódási pontok szerinti glikozilációs eloszlásának vizsgálatához a tripszines emésztmény MALDI-TOF MS vizsgálata egy Voyager DE-Pro MALDI-TOF (Applied Biosystems, Framingham, MA), továbbá egy Waters CapLC HPLC-rendszerrel kapcsolt nanospray ionforrással felszerelt Micromass QToF Micro (Manchester, EK) tömegspektrométeren, pozitív ionizációs módban történtek. A glikopeptidek szelektív detektálása és MS/MS felvételük survey scan módban (Parent Ion Discovery) készült.

A különböző, tumoros (16 ováriumtumoros és 15 limfómás) és egészséges (12 kontroll) egyedekből származó AGP minták PNGáz F enzimmel hidrolizált és antranilsavval derivatizált oligoszacharidjainak tömegspektrometriás vizsgálatait egy Voyager DE-Pro MALDI-TOF (Applied Biosystems, Framingham, MA) tömegspektrométeren történtek. A kapott oligoszacharid profil lineáris diszkriminancia analízissel (LDA) történő kiértékeléséhez STATISTICA 7.0 programot használtam fel (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

### III. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Megvalósítottuk a BLG és a cisz-parinársav nemkovalens komplexének specifikus, 1:1 sztöchiometriájú kötődésének ESI-MS módszerrel történő kimutatását. A kötés specificitását kompetitív kötődési kísérletekkel igazoltuk, amelyekben a különböző szénatomszámú telített és telítetlen zsírsavak jelenléte mellett vizsgáltuk a BLG-cPA komplexet. A kapott eredményekből megállapítottuk, hogy a legintenzívebb komplexeket minden esetben a BLG-cPA eredményezte. A BLG-hez történő kiemelkedő kötődési tulajdonságáért valószínű, hogy a cPA megfelelő mérete, láncvégi karboxilcsoportja, valamint konjugált kettőskötésrendszere a felelős. (V. I közlemény)
2. Limitált tripszinolízises mintaelőkészítést tömegspektrometriás analízissel kombinálva sikerült olyan módszert kidolgoznunk, amellyel a BLG molekula egy olyan részletéhez jutottunk, amely közvetlenül részt vesz a komplexképzésben. A kapott fehérjefragmentum szerkezetét azonosítottuk; ez a diszulfidhíddal összekötött [41-70]S-S[149-162] fragmens az intakt molekulához hasonlóan komplexálta a cPA-t. (V. I közlemény)
3. Új módszert dolgoztunk ki a rendkívül heterogén szerkezetű AGP glikozilációs pontok szerinti oligoszacharid eloszlásának tanulmányozására. A tripszines emésztés mintaelőkészítési lépésében elsőként alkalmaztunk sikeresen egy új, addig többnyire csak membránfehérjékhez használt felületaktív anyagot (RapiGest<sup>SF</sup>), aminek eredményeként a proteolízis az eddigiéknél jóval sikeresebb volt. (V.II közlemény)

4. A kapott rendkívül komplex peptid-glikopeptid keveréket capHPLC-ESI-QTOF technikával vizsgáltuk, és a glikopeptideket szelektíven (karakterisztikus oxóniumionjaik segítségével) detektáltuk, amivel megvalósítottuk az AGP N-glikánok eloszlásának kapcsolódási pont szerinti meghatározását. A módszerrel az irodalomban eddig található glikopeptidek számánál kb. háromszoros mennyiségű AGP glikopeptid struktúrát (kb. 80) azonosítottunk, amelyek szerkezetét MS/MS mérésekkel igazoltunk. Eredményeinkből megállapítottuk, hogy az egyes glikozileződési pontok oligoszacharid eloszlása jelentősen eltérő, ami a molekula szerkezeti változatosságát tovább növeli. Az I és II kapcsolódási helyek főleg tri-antennáris, míg a III, IV és az V glikozileződési pontokon tetra-antennáris komplex oligoszacharidok dominálnak. A IV és V pozícióban további N-acetil-laktózamin (Gal-GlcNAc) egységek beépülését tapasztaltuk, ami még nagyobb mértékű elágazást, ill. még hosszabb láncokat tartalmazó glikánok jelenlétét igazolja. (V. II közlemény)
5. Az AGP glikozilációs mintázatának a lehasított oligoszacharidok szintjén történő tanulmányozása során az AGP-ről hidrolizált és antranilsavval származékolt N-glikánjainak MALDI-TOF-MS szerkezetvizsgálatát valósítottuk meg. A módszerrel nagyszámú (43) egyedi minta (egészséges kontroll, limfómás és ováriumtumoros esetek) AGP N-glikánjait vizsgáltuk meg, amelyekből 34 különböző glikánstruktúrát azonosítottunk. A minták tömegspektrometriás analízise során megfigyelhető volt, hogy az egészségesekkel összehasonlítva a tumoros minták esetében a nagyobb elágazásszámú tetra-antennáris és a fukózt tartalmazó molekulák aránya magasabb volt.
6. Az AGP oligoszacharidok MALDI-MS analíziséből származó relatív intenzitás adatokból fukóz- és antennaindexet definiáltunk, amelyek alapján a fukózindex bizonyos mértékű elkülönülést mutatott az egyes csoportok között. Az átlagos fukózindex az ováriumtumoros és limfómás csoportokban 45, illetve 60%-al volt nagyobb az egészséges csoporthoz viszonyítva.
7. A kapott eredmények kemometriás (LDA) analízisét is elvégeztük, amelyek biztató eredményeket hoztak; az adathalmazon mért relatív oligoszacharid intenzitások alapján a három csoport jól elkülönült egymástól (88%

klasszifikáció). A keresztellenőrzés (validálás) is azt mutatta, hogy a módszerünknek megfelelő az előrejelző képessége: a daganatos és egészséges minták megkülönböztetéséhez 96%-os szelektivitás és 93%-os specificitás tartozik. A limfóma azonosítására számolt értékek is biztatóak voltak (72 % szelektivitás és 84% specificitás).

#### **IV. EREDMÉNYEK JELENTŐSÉGE ÉS ALKALMAZÁSI LEHETŐSÉGE**

Nemkovalens kölcsönhatásokat alaposabban megismerve lehetőség nyílt pl. gyógyszermolekulák célzott szervezetbejuttatására. Az általunk vizsgált vízoldhatatlan *cis*-parinársav *in vitro* vizsgálatokban antitumor hatást mutatott rákos sejtekkel szemben. A célsejtekhez való jutásához és így a hatásának kifejtéséhez stabil nemkovalens komplexet képezve a BLG potenciális szállítómolekulaként funkcionálhat, amennyiben a megfelelő helyre szállíthatná molekulát.

Disszertációmban bemutatott eredmények azt mutatják, hogy a glikozileződés, ill. konkrétan az AGP glikozileződése a betegségre jellemző mintázatot mutat, így ez potenciálisan egy új, széles körben elfogadott onkomarker lehetőségét rejti magában. Eredményeink új utakat nyithatnak meg a rákkutatásban, amely a magas daganatos halálozási statisztikák miatt sürgős megoldásokat kíván.

## V. KÖZLEMÉNYEK

### Az értekezés alapjául szolgáló, saját közlemények

- I. **Tímea Imre**, Ferenc Zsila and Pál T. Szabó, Electrospray mass spectrometric investigation of the binding of cis-parinaric acid to bovine beta-lactoglobulin and study of the ligand-binding site of the protein using limited proteolysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2003. 17(22): p. 2464-2470. (IF: 2,789-**2003**.)
- II. **Tímea Imre**, Gitta Schlosser, Gabriella Pocsfalvi, Rosa Siciliano, Éva Molnár-Szöllsi, Tibor Kremmer, Antonio Malorni, Károly Vékey, Glycosylation site analysis of human alpha-1-acid glycoprotein (AGP) by capillary liquid chromatography - electrospray mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 2005. 40 (11): p. 1472-1483. (IF:3,574-**2005**.)
- III. **Tímea Imre**, Tibor Kremmer, Károly Héberger, Éva Molnár-Szöllösi, Krisztina Ludányi, Gabriella Pócsfalvi, Antonio Malorni, László Drahosza, Károly Vékey, Mass spectrometric and linear discriminant analysis of N-glycans of human serum alpha-1-acid glycoprotein in cancer patients and healthy individuals, *Journal of Proteomics* 2008. 71 (2): p. 186-197. (2008-ban indult IF-os folyóirat, 2009 még nincs IF)

### A doktori munkához kapcsolódó egyéb közlemények:

1. Zsila, F., **T. Imre**, P.T. Szabó, Z. Bikádi and M. Simonyi, Induced chirality upon binding of cis-parinaric acid to bovine beta-lactoglobulin: spectroscopic characterization of the complex. *Febs Letters*, 2002. 520(1-3): p. 81-87.
2. Kovári, J., **T. Imre**, P. Szabó and B.G. Vértessy, Mechanistic studies of dUTPases. *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids*, 2004. 23(8-9): p. 1475-1479.
3. Kovári, J., O. Barabás, E. Takács, A. Békési, F. Dubrovay, V. Pongrácz, I. Zagyva, **T. Imre**, P. Szabó and B.G. Vértessy, Altered active site flexibility and a structural metal-binding site in eukaryotic dUTPase - Kinetic characterization, folding, and crystallographic studies of the homotrimeric Drosophila enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 2004. 279(17): p. 17932-17944.
4. Kremmer, T., E. Szöllösi, M. Boldizsár, B. Vincze, K. Ludányi, **T. Imre**, G. Schlosser and K. Vékey, Liquid chromatographic human serum acid and mass spectrometric analysis of alpha-1-glycoprotein. *Biomedical Chromatography*, 2004. 18(5): p. 323-329.
5. Nagy, K., K. Vékey, **T. Imre**, K. Ludányi, M.P. Barrow and P.J. Derrick, Electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry of human alpha-1-acid glycoprotein. *Analytical Chemistry*, 2004. 76(17): p. 4998-5005.
6. Szöllösi, T., T. Kremmer, K. Ludányi, **T. Imre**, G. Schlosser, M. Boldizsár, B. Vincze and K. Vékey, A novel method for the separation and purification of human serum

acid alpha-1-glycoprotein. Liquid chromatographic and mass spectrometric investigation of tryptic fragments. *Chromatographia*, 2004. 60: p. S213-S219.

#### **A doktori munkához nem kapcsolódó (válogatott) közlemények:**

1. Novák T., Keglevich Gy., **Imre T.**, Bakó P., Újszászy K., Ludányi K., Tőke L.: Foszfonoalkil oldalláncot tartalmazó azakoronák szintézise és komplexképzési tulajdonságainak a vizsgálata, *Magy. Kém. Folyóirat*, 105, 16 (1999)
2. Keglevich, G., T. Novák, **T. Imre**, P. Bakó, L. Tőke, K. Újszászy and K. Ludányi, Synthesis and cation binding ability of azacrown ethers with phosphine or phosphine oxide side chain. *Heteroatom Chemistry*, 1999. 10(7): p. 573-576.
3. Novák, T., P. Bakó, **T. Imre**, G. Keglevich, A. Dobó and L. Tőke, Synthesis and cation binding ability of the phosphonoalkyl- and phosphinoylalkyl derivatives of monoaza-18-crown-6. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 2000. 38(1-4): p. 435-443
4. Keglevich, G., T. Novák, P. Bakó, T. Bakó, **T. Imre** and L. Tőke, The synthesis and utilization of azacrown ethers with phosphorus function in the side chain. *Phosphorus Sulfur and Silicon and the Related Elements*, 2002. 177(8-9): p. 1995-1995.
5. Keglevich, G., L. Nyulászi, T. Chuluunbaatar, B.A. Namkhainyambuu, K. Ludányi, **T. Imre** and L. Toke, endo and exo Ring fusion in the Diels-Alder reaction of 1-(2,4,6-trialkylphenyl)3-methylphospholes with maleic acid derivatives. *Tetrahedron*, 2002. **58**(49): p. 9801-9808.
6. Keglevich G, Sipos M, Lengyel D, Forintos H, Körtvélyesi T, **Imre T**, Tőke L Synthesis of 1-aryl-1,2,3,4,5,6-hexahydrophosphinine 1-oxides *Synthetic Communications*, 2004. **4** (22): p. 4159-4169
7. Keglevich G, Sipos M, Körtvélyesi T, Imre T, Tőke L, 1,2,3,4,5,6-Hexahydrophosphinine 1-oxides with an exocyclic P-function at position 3: diastereoselective synthesis, stereostructure and conformation *Tetrahedron Letters* 2005. 46 (10): p. 1655-1658.

#### **Munkánkból tartott előadások:**

1. **Imre Tímea**, Zsila Ferenc, Simonyi Miklós, Szabó Pál:  $\beta$ -laktoglobulin és cisz-parinársav nem-kovalens komplexképzésének vizsgálata ESI-tömegspektrometriás módszerrel, *Peptidkémiai Munkabizottsági Ülés*, Balatonszemes, 2002. május 29-31.
2. **Imre Tímea**, Zsila Ferenc, Simonyi Miklós, Szabó Pál: A  $\beta$ -laktoglobulin és cisz-parinársav nemkovalens komplexképzésének tömegspektrometriás vizsgálata (*V. Doktori Kémiai Iskola*, Királyrét, 2002. május 21-22.



3. **Imre Tímea**, Ludányi Krisztina, Schlosser Gitta, Kremmer Tibor, Szöllősi Éva, Vékey Károly: Human szérum AGP tömegspektrometriás vizsgálata; *Peptidkémiai Munkabizottság és az Nukleotidkémiai Munkabizottság együttes tudományos ülése* 2003. május 26-28., Balatonszemes
4. **Imre Tímea**, Ludányi Krisztina, Kremmer Tibor, Molnárné Szöllősi Éva, Vékey Károly, Human szérum AGP tömegspektrometriás vizsgálata, *Tömeg - és molekulaspektrometria alkalmazási lehetőségei az orvosi diagnosztikában; Szakmai Szeminárium*, Budapest MTA KKKI 2004. április 14.
5. **Imre Tímea**, Ludányi Krisztina, Kremmer Tibor, Molnárné Szöllősi Éva, Vékey Károly; A humán szérum alfa-1-savas glikoprotein oligoszacharidjainak MALDI-MS vizsgálata; „*Analitikai Vegyészkonferencia 2004.*” 2004. június 30 - július 2. Balatonföldvár, Hotel Riviera

#### **Munkánkból született poszter bemutatók:**

1. **Tímea Imre**, Ferenc Zsila, Miklós Simonyi, Pál T. Szabó: Investigation of binding cis-parinaric acid to bovine  $\beta$ -lactoglobulin by electrospray ionization and matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry *20th Informal Meeting on Mass Spectrometry*, Fierra di Primiero, Italy (2002).
2. **Imre Tímea**, Vértessy Beáta, Zsila Ferenc, Szabó Pál: Fehérjék kötőhelyének tömegspektrometriás vizsgálata limitált tripszines hidrolzissal, *METT Elválasztástudományi Vándorgyűlés*, Lillafüred 2002. október 16-18.
3. **Tímea Imre**, Krisztina Ludányi, Gitta Schlosser, Tibor Kremmer, Éva Szöllősi, Károly Vékey: Investigation of oligosaccharides of human serum alpha-1-acid-glycoprotein by MALDI-TOF MS, *21st Informal Meeting on Mass Spectrometry*, Antwerp, 11-15 May, 2003.
4. **Imre Tímea**, Zsila Ferenc, Szabó Pál: Béta-laktoglobulin kötőhelyének limitált tripszinolízises vizsgálata electrospray ionizációs tömeg-spektrometriás technikával Magyar Kémikusok Egyesülete, „*Vegyészkonferencia 2003*”, Hajdúszoboszló 2003. június 26-28.,
5. **Tímea Imre**; Ferenc Zsila, Pál T. Szabó: Electrospray mass spectrometric investigation of binding cis-Parinaric acid to bovine beta-lactoglobulin and studying the ligand-binding site of the protein using limited proteolysis, *16th International Mass Spectrometry Conference*, Edinburgh, 31 Aug - Sept. 5, 2003.
6. T. Kremmer, M. É. Szöllősi, B. Vincze, M. Boldizsár, K. Ludányi, K. Vékey, **T. Imre**, G. Schlosser: RP-HPLC and Mass Spectrometry of Tryptic Fragments Derived from Human Serum AGP. *5<sup>th</sup> Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods*, Siófok, 3-5<sup>th</sup> September, 2003.

7. **Tímea Imre**, Krisztina Ludányi, Tibor Kremmer, Éva Szöllősi, Károly Vékey; MALDI-TOF MS investigation of the oligosaccharide content of human serum alpha-1-acid-glycoprotein; *22nd Informal Meeting on Mass Spectrometry*; Tokaj, Hungary 2-6 May, 2004.
8. Molnár-Szöllősi É., **Imre T.**, Ludányi K., Kremmer T., Vékey K.: Humán szérumban savanyú  $\alpha$ 1 glikoprotein oligoszacharid-tartalmának elválasztása és vizsgálata daganatos megbetegedésekben, *METT Elválasztástudományi Vándorgyűlés*, Hévíz, 2004. szeptember 22-24.
9. **Imre T.**, Ludányi K., Molnárné Szöllősi É., Kremmer T., Pócsfalvi G., Malorni A., Vékey K. Humán szérumban savanyú  $\alpha$ 1-glikoprotein (AGP) glikozilációs pozícióinak felderítése RP capLC-QToF MS technikával *METT Elválasztástudományi Vándorgyűlés*, Hévíz, 2004. szeptember 22-24.
10. Molnár-Szöllősi Éva, **Imre Tímea**, Ludányi Krisztina, Vékey Károly, Kremmer Tibor: Humán szérumban savanyú  $\alpha$ 1-glikoprotein szerkezeti mikroheterogenitásának vizsgálata, *MKE „Vegyészkonferencia 2005”*, Hajdúszoboszló, 2005. június 28-30.
11. Molnár-Szöllősi Éva, **Imre Tímea**, Pulay Tamás, Rosta András, Schneider Tamás, Vékey Károly, Kremmer Tibor: A humán szérumban savanyú  $\alpha$ 1-glikoprotein oligoszacharid szerkezetének vizsgálata daganatos megbetegedésekben, *Magyar Onkológusok Társaságának XXVI. Kongresszusa*, Budapest, 2005. november 3-5.
12. É. Molnár-Szöllősi, T. **Imre**, T. Kremmer, B. Vincze, K. Vékey, A. Rosta, T. Pulay, T. Schneider: Functional proteomics of human serum alpha-1-acid glycoprotein. 19<sup>th</sup> Meeting of the European Association for Cancer Research (EACR 2006), Budapest, Hungary, 1-4<sup>th</sup> July, 2006.
13. **Tímea Imre**, Károly Héberger, László Drahos, Tibor Kremmer Éva Szöllősi, Gabriella Pócsfalvi, Károly Vékey, Mass spectrometric and statistical analysis of N-glycans of human serum alpha-1-acid glycoprotein from cancer patients and healthy individuals, *Conferentia Chemometrica*, Budapest, Hungary, September 2-5, 2007.