

Aus dem Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

**Untersuchung neuartiger Disulfid-Addukte aus humanem  
Plasma als Biomarker zum Nachweis einer Vergiftung mit  
phosphororganischen Cholinesteraseinhibitoren**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Andreas Stephan Kranawetvogl

aus  
Berchtesgaden

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Franz Worek

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Michael Vogeser  
Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Anton Eberharter  
Priv.-Doz. Dr. med. habil. Sybille Kraus

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. rer. nat. Harald John

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 14.05.2019

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

### **Untersuchung neuartiger Disulfid-Addukte aus humanem Plasma als Biomarker zum Nachweis einer Vergiftung mit phosphororganischen Cholinesteraseinhibitoren**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 20. Mai 2019

---

Andreas Kranawetvogl

*Für Tamara*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Publikationsliste</b>	<b>6</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>8</b>
<b>1 Einführung</b>	<b>10</b>
1.1 Phosphororganische Verbindungen . . . . .	10
1.1.1 Einteilung und chemische Strukturen . . . . .	10
1.1.2 Toxikokinetik und Toxikodynamik . . . . .	11
1.1.3 Therapie bei Vergiftungen . . . . .	14
1.2 Verifikationsanalytik . . . . .	15
1.2.1 Rechtliche und politische Bedeutung . . . . .	15
1.2.2 Biomarker einer Vergiftung mit phosphororganischen Verbindungen	16
<b>2 Zielsetzung</b>	<b>18</b>
<b>3 Veröffentlichungen</b>	<b>20</b>
3.1 Erste Veröffentlichung . . . . .	20
3.2 Zweite Veröffentlichung . . . . .	23
3.2.1 Artikel . . . . .	23
3.2.2 Supplement . . . . .	26
3.3 Dritte Veröffentlichung . . . . .	31
3.3.1 Artikel . . . . .	31
3.3.2 Supplement . . . . .	34
3.4 Vierte Veröffentlichung . . . . .	48
3.4.1 Artikel . . . . .	48
3.4.2 Supplement . . . . .	51
<b>4 Zusammenfassung</b>	<b>57</b>
<b>5 Abstract</b>	<b>58</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>59</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>64</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>65</b>

# Publikationsliste

Publikationen der kumulativen Dissertation:

1. **A. Kranawetvogl**, F. Worek, H. Thiermann, H. John. Modification of human serum albumin by the nerve agent VX: Microbore liquid chromatography/electrospray ionization high-resolution time-of-flight tandem mass spectrometry method for detection of phosphonylated tyrosine and novel cysteine containing disulfide adducts. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 30:2191–2200, 2016.  
DOI: 10.1002/rcm.7707
2. **A. Kranawetvogl**, J. Küppers, M. Gütschow, F. Worek, H. Thiermann, P. W. Elsinghorst, H. John. Identification of novel disulfide adducts between the thiol containing leaving group of the nerve agent VX and cysteine containing tripeptides derived from human serum albumin. *Drug Testing and Analysis*, 9:1192–1203, 2017.  
DOI: 10.1002/dta.2144
3. **A. Kranawetvogl**, J. Küppers, M. Siegert, M. Gütschow, F. Worek, H. Thiermann, P. W. Elsinghorst, H. John. Bioanalytical verification of V-type nerve agent exposure: Simultaneous detection of phosphonylated tyrosines and cysteine-containing disulfide-adducts derived from human albumin. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410:1463–1474, 2018.  
DOI: 10.1007/s00216-017-0787-7
4. H. John, M. Siegert, F. Eyer, F. Worek, H. Thiermann, **A. Kranawetvogl**. Novel cysteine- and albumin-adduct biomarkers to prove human poisoning with the pesticide oxydemeton-*S*-methyl. *Toxicology Letters*, 294:122–134, 2018.  
DOI: 10.1016/j.toxlet.2018.05.023

Weitere Publikationen:

1. **A. Kranawetvogl**, J. Schüler, S. Müller, H. Thiermann, F. Worek, G. Reiter. Elimination pathways of cyclosarin (GF) mediated by  $\beta$ -cyclodextrin in vitro: Pharmacokinetic and toxicokinetic aspects. *Toxicology Letters*, 222:164–170, 2013.
2. **A. Kranawetvogl**, S. Müller, S. Kubik, H. Spruit, H. Thiermann, F. Worek, D. Noort, G. Reiter. Elimination kinetics and molecular reaction mechanisms of cyclosarin (GF) by an oxime substituted  $\beta$ -cyclodextrin derivative in vitro. *Toxicology Letters*, 239:41–52, 2015.
3. H. John, M. Siegert, F. Gandor, M. Gawlik, **A. Kranawetvogl**, K. Karaghiosoff, H. Thiermann. Optimized verification method for detection of an albumin-sulfur mustard adduct at Cys<sup>34</sup> using a hybrid quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometer after direct plasma proteolysis. *Toxicology Letters*, 244:103–111, 2016.
4. M. Siegert, **A. Kranawetvogl**, H. Thiermann, H. John. Glutathione as an antidote for sulfur mustard poisoning: Mass spectrometric investigations of its potency as a chemical scavenger. *Toxicology Letters*, 293:31–37, 2017.

5. M. Siegert, **A. Kranawetvogl**, H. Thiermann, H. John. N-Acetylcysteine as a chemical scavenger for sulfur mustard: New insights by mass spectrometry. *Drug Testing and Analysis*, 10:243–253, 2018.

Posterpräsentationen:

1. **A. Kranawetvogl**, F. Worek, H. Thiermann, H. John. Identification of cysteine-proline (CP) disulfide adducts from human serum albumin with V-type nerve agents: New exposure marker for bioanalytical verification. 46. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Wehrmedizin und Wehrpharmazie e.V. (DGWMP), Oldenburg, D, 15.–17.10.2015.
2. **A. Kranawetvogl**, F. Worek, H. Thiermann, H. John. Modification of human serum albumin by V-type nerve agents:  $\mu$ LC-ESI HR MS/MS method for simultaneous detection of phosphorylated tyrosines and novel cysteine-proline disulfide adducts. 13. Anwendertreffen LC-MS/MS in der Labormedizin der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin e.V. (DGKL), Bad Staffelstein, D, 26.–27.10.2015.
3. H. John, M. Siegert, F. Gandor, M. Gawlik, **A. Kranawetvogl**, H. Thiermann. Novel  $\mu$ LC-ESI MS/MS methods for evidence of sulfur mustard exposure by detection of an albumin-derived biomarker in forensic human plasma samples. 13. Anwendertreffen LC-MS/MS in der Labormedizin der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin e.V. (DGKL), Bad Staffelstein, D, 26.–27.10.2015.
4. **A. Kranawetvogl**, H. Thiermann, H. John.  $\mu$ LC-ESI HR MS/MS method for bioanalytical verification of exposure to V-type nerve agents by simultaneous detection of diverse albumin-adducts. 49. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS), Hamburg, D, 28.02.–02.03.2016.
5. **A. Kranawetvogl**, H. Thiermann, A. Tsoutsoulopoulos, H. John. Cysteine-proline disulfide adducts from human serum albumin as potential novel biomarkers for verification of exposure to V-type nerve agents. 82. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie e.V. (DGPT), Berlin, D, 29.02.–03.03.2016.
6. **A. Kranawetvogl**, F. Worek, H. Thiermann, P. Winterhalter, H. John. Verification of organophosphorus pesticide poisoning: Detection of biomarkers derived from human serum albumin after intoxication with omethoate/dimethoate. 48. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Wehrmedizin und Wehrpharmazie e.V. (DGWMP), Gladbeck, D, 26.–28.10.2017.
7. **A. Kranawetvogl**, J. Küppers, M. Gütschow, F. Worek, H. Thiermann, P. W. Elsinghorst, H. John. Verification of V-type nerve agent exposure: Detection of disulfide-adducts between the leaving group of VX and cysteine-containing peptides derived from human serum albumin. International Workshop on Analysis of Chemical Warfare Agents to mark the 20<sup>th</sup> Anniversary of the CWC, Helsinki, FIN, 11.–13.12.2017.

# Abkürzungsverzeichnis

<b>ACh</b>	Acetylcholin
<b>AChE</b>	Acetylcholinesterase
<b>BChE</b>	Butyrylcholinesterase
<b>CVX</b>	Chinesisches VX
<b>CWÜ</b>	Chemiewaffenübereinkommen
<b>DEAET</b>	Diethylaminoethanthiol
<b>DEAET-CP</b>	CysPro-Dipeptid-Disulfid-Addukt mit CVX oder RVX
<b>DIC-DEAET</b>	AspIleCys-Tripeptid-Disulfid-Addukt mit CVX oder RVX
<b>DIC-DPAET</b>	AspIleCys-Tripeptid-Disulfid-Addukt mit VX
<b>DPAEMS</b>	Diisopropylaminoethylmethylsulfid
<b>DPAET</b>	Diisopropylaminoethanthiol
<b>DPAET-CP</b>	CysPro-Dipeptid-Disulfid-Addukt mit VX
<b>DSMS</b>	Demeton- <i>S</i> -methyl sulfon
<b>EA-2192</b>	toxischer Metabolit von VX
<b>EDTA</b>	Ethylendiaminotetraessigsäure
<b>EMPS</b>	Ethylmethylphosphonsäure
<b>ESOET</b>	2-(Ethylsulfinyl)ethanthiol
<b>ESO<sub>2</sub>ET</b>	2-(Ethylsulfonyl)ethanthiol
<b>FFM</b>	Fact-Finding Mission
<b>GA</b>	Tabun
<b>GB</b>	Sarin
<b>GD</b>	Soman
<b>HSA</b>	humanes Serumalbumin
<b>ISD</b>	in-source decay
<b>LC-MS</b>	Kopplung von Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie
<b>LOD</b>	limit of detection
<b>MPC-DEAET</b>	MetProCys-Tripeptid-Disulfid-Addukt mit CVX oder RVX
<b>MPC-DPAET</b>	MetProCys-Tripeptid-Disulfid-Addukt mit VX
<b>MPS</b>	Methylphosphonsäure

<b>ODM</b>	Oxydemeton- <i>S</i> -methyl
<b>OPCW</b>	Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons
<b>OVCW</b>	Organisation für das Verbot Chemischer Waffen
<b>PON1</b>	Paraoxonase 1
<b>RVX</b>	Russisches VX
<b>TiPC</b>	Tetraisopropylcystamin
<b>Tyr-DMP</b>	ODM- oder DSMS-Tyrosin-Addukt ( <i>O,O</i> -Dimethylphosphotyrosin)
<b>Y-CVX</b>	CVX-Tyrosin-Addukt ( <i>O</i> -Butylmethylphosphonotyrosin)
<b>Y-RVX</b>	RVX-Tyrosin-Addukt ( <i>O</i> -(2-Methylpropyl)methylphosphonotyrosin)
<b>Y-VX</b>	VX-Tyrosin-Addukt ( <i>O</i> -Ethylmethylphosphonotyrosin)

# 1 Einführung

## 1.1 Phosphororganische Verbindungen

### 1.1.1 Einteilung und chemische Strukturen

Bei einer phosphororganischen Verbindung handelt es sich um eine Substanz, die analog der von Dr. Gerhard Schrader im Jahr 1957 publizierten Formel aufgebaut ist (Abbildung 1).

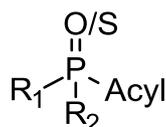


Abbildung 1: Grundsätzlicher Aufbau einer phosphororganischen Verbindung (Schrader-Formel) nach [1]. R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>: Alkyl-/Alkoxy-Rest; Acyl: F, CN, Phenolat, Enolat, Thiolat

Je nachdem ob es sich um Derivate der Phosphorsäure (R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub>: Alkoxy-Reste) oder Phosphonsäure (R<sub>1</sub> oder R<sub>2</sub>: Alkyl-Rest) handelt, wird in Organophosphate oder Organophosphonate unterschieden [2]. Zusätzlich ist die Einteilung anhand des Charakters der Phosphor-Doppelbindung in die jeweiligen Oxo- (P=O) und Thio-Verbindungen (P=S) möglich. Die historisch geprägte Bezeichnung „Acyl“ für den letzten Substituenten am zentralen P-Atom wird inzwischen kaum noch verwendet, da darunter gemäß der modernen chemischen Nomenklatur ein Carbonsäure-Rest verstanden wird. Stattdessen wird von der „Abgangsgruppe“ (englisch „leaving group“) gesprochen, da dieser Molekülteil bei der Reaktion mit Nukleophilen, wie beispielsweise bestimmten Aminosäuren in körpereigenen Proteinen, abgespalten wird [3].

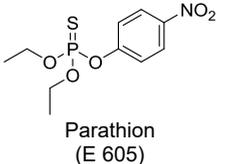
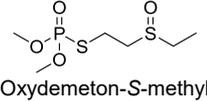
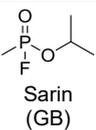
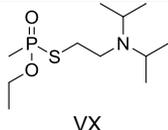
Eine weitere Einteilungsmöglichkeit ergibt sich aus der Zweckbestimmung phosphororganischer Verbindungen:

Einerseits werden Organophosphate überwiegend als Pestizide zur Schädlingsbekämpfung eingesetzt und stellen damit die Ernährung einer stets wachsenden Weltbevölkerung sicher. Bedeutende Vertreter sind beispielsweise Parathion (E 605) oder das zur Gruppe der Systox-Präparate zählende Oxydemeton-*S*-methyl [1] (Tabelle 1).

Andererseits zählen die hochpotenten Organophosphonate nahezu ausschließlich zur Klasse der Nervenkampfstoffe und werden historisch bedingt nach der Reihenfolge ihrer Entwicklung in G-Stoffe und V-Stoffe eingeteilt [3–5] (Tabelle 1):

- (a) Zu den G-Stoffen (G für „Germany“), die unter der Leitung Dr. Gerhard Schraders bei der Farbenfabriken Bayer A.G. in den 1930er und 1940er Jahren entwickelt wurden, zählen bekannte Vertreter wie Tabun (GA), Sarin (GB) (Tabelle 1) und Soman (GD).
- (b) In den 1950er und 1960er Jahren führten weitergehende systematische Untersuchungen zu Struktur-Aktivitäts-Beziehungen durch das Vereinigte Königreich, die Vereinigten Staaten von Amerika und Kanada zur Entwicklung der V-Stoffe (V für „venomous“). Zu den prominentesten Vertretern zählen die Leitsubstanz VX (Tabelle 1) sowie die in China und der Sowjetunion entwickelten Analoga Chinesisches VX (CVX) und Russisches VX (RVX).

Tabelle 1: Einteilung phosphororganischer Verbindungen in Pestizide und Nervenkampfstoffe mit ausgewählten Beispielstrukturen.

Pestizide		Nervenkampfstoffe	
		G-Stoffe	V-Stoffe
			
Parathion (E 605)	Oxydemeton-S-methyl	Sarin (GB)	VX

Der Vollständigkeit halber sei an dieser Stelle noch auf die Verwendung einiger phosphororganischer Verbindungen als Weichmacher oder Flammschutzmittel hingewiesen [6]. Da derartige Substanzen allerdings nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit waren, wird auf eine weitergehende Betrachtung verzichtet.

### 1.1.2 Toxikokinetik und Toxikodynamik

#### Toxikokinetik

Die Wirkstärke einer toxischen Verbindung hängt sowohl vom Ausmaß als auch von der Geschwindigkeit ab, mit der das Gift am Wirkort verfügbar wird. Daher befasst sich die Toxikokinetik mit den vier hierfür entscheidenden Vorgängen Absorption, Distribution, Biotransformation und Exkretion [7]. Im Folgenden soll auf die Toxikokinetik phosphororganischer Verbindungen näher eingegangen werden:

#### (a) Absorption

Am häufigsten treten Vergiftungen mit phosphororganischen Verbindungen durch direkten Hautkontakt, Inhalation oder Verschlucken auf [8]. Der vernachlässigbar kleine Dampfdruck und die hohe Lipophilie der V-Stoffe ermöglichen eine gute Penetration der Haut mit anschließender Aufnahme in die Blutbahn. Demgegenüber weisen G-Stoffe einen deutlich höheren Dampfdruck auf, sodass diese Verbindungen überwiegend über die Atemwege aufgenommen werden. Prinzipiell besteht aber auch die

Möglichkeit, dass bei Anwendung explosiver Trägersysteme selbst schwerflüchtige Nervenkampfstoffe durch Bildung hochfeiner Aerosole eingeatmet und auf diese Weise in den Körper aufgenommen werden. Die Exposition durch Verschlucken spielt vor allem bei Pestiziden eine Rolle, da diese entweder unbewusst als Rückstände mit pflanzlichen Lebensmitteln oder aber in suizidaler Absicht bewusst aufgenommen werden [9, 10].

(b) Distribution

Im Anschluss an die Aufnahme phosphororganischer Verbindungen in die Zirkulation erfolgt die Verteilung im ganzen Körper. Besonders problematisch ist dabei die Tatsache, dass viele Pestizide und vor allem Nervenkampfstoffe aufgrund ihrer hohen Lipophilie die Blut-Hirn-Schranke überwinden und damit auch im zentralen Nervensystem wirken können [8]. Daneben spielt die Einlagerung ins Fettgewebe eine wichtige Rolle, da es dadurch zur Bildung eines Depots mit verzögerter Freisetzung und erneutem Auftreten von Vergiftungssymptomen kommen kann [11].

(c) Biotransformation

Bei der Biotransformation von Xenobiotika wird typischerweise in Phase-I-Reaktionen (Funktionalisierung, zum Beispiel Oxidation) und Phase-II-Reaktionen (Konjugation, zum Beispiel Sulfatierung) unterschieden [7]. Bei phosphororganischen Verbindungen sind dabei vor allem Phase-I-Reaktionen von Bedeutung.

Bereits im Blutplasma werden bestimmte Pestizide und Nervenkampfstoffe durch das Enzym Paraoxonase 1 (PON1, EC 3.1.8.1) hydrolysiert (Abspaltung der Abgangsgruppe) und dadurch in nicht-toxische Verbindungen umgewandelt [8]. Aufgrund eines Polymorphismus im PON1-Gen existieren zudem zwei unterschiedlich aktive Isoformen, wodurch die individuelle Anfälligkeit gegenüber bestimmten phosphororganischen Verbindungen erklärt werden kann [12].

Andererseits können Phase-I-Reaktionen aber auch zu einer Aktivierung von Verbindungen führen und dadurch deren Toxizität erhöhen [7]. Auf diese Weise werden Thio-Pestizide in der Leber durch Cytochrom P450 Enzyme oxidativ desulfuriert und in die entsprechenden Oxo-Verbindungen überführt [13]. Diese sind aufgrund der stärker polarisierten P=O-Bindung deutlich reaktiver und damit auch toxischer. Analog zur PON1 unterliegen Cytochrom P450 Enzyme ebenfalls einem ausgeprägten Polymorphismus, weshalb der Verlauf einer Vergiftung im konkreten Einzelfall nur schwer vorhergesagt werden kann [14].

(d) Exkretion

Die Biotransformation phosphororganischer Verbindungen führt zu stark hydrophilen Phosphor- und Phosphonsäurederivaten, die meist innerhalb weniger Stunden überwiegend renal eliminiert werden [8]. Andere Ausscheidungswege, wie beispielsweise die hepatische Elimination, spielen dabei nur eine untergeordnete Rolle.

Toxikodynamik

Im Unterschied zur Toxikokinetik befasst sich die Toxikodynamik mit der Interaktion einer toxischen Verbindung mit ihren Zielstrukturen (zum Beispiel Rezeptoren, Enzymen) und erklärt damit die beobachteten Vergiftungssymptome [7].

Die Hauptwirkung phosphororganischer Verbindungen beruht auf der irreversiblen Hemmung des Enzyms Acetylcholinesterase (AChE, EC 3.1.1.7), das für den Abbau des Neurotransmitters Acetylcholin (ACh) im Körper zuständig ist [2, 11] (Abbildung 2a). Durch Phosphorylierung von Ser<sup>203</sup> im aktiven Zentrum der humanen AChE wird diese inaktiviert und verliert dadurch ihre Funktion [15] (Abbildung 2b, c). Unter Phosphorylierung wird dabei sowohl die Phosphorylierung durch Organophosphate (Pestizide) als auch die Phosphonylierung durch Organophosphonate (Nervenkampfstoffe) verstanden [16]. In der Folge kommt es zur Akkumulation von ACh im synaptischen Spalt, wodurch sowohl muskarinische als auch nikotinische ACh-Rezeptoren überstimuliert werden (cholinerge Krise) [15]. Die typischen Symptome einer Vergiftung mit phosphororganischen Verbindungen werden in periphere muskarinartige Wirkungen (zum Beispiel gastrointestinale Beschwerden, starkes Schwitzen, Miosis, Blutdruckabfall, verstärkte Bronchialsekretion), periphere nikotinartige Wirkungen (zum Beispiel Muskelzuckungen, Muskelschwäche, periphere Atemlähmung) und zentralnervöse Wirkungen (zum Beispiel Angst, Schwindel, Tremor, Krämpfe, zentrale Atemlähmung) eingeteilt [17]. Besonders gefährlich sind dabei die verstärkte Bronchialsekretion sowie die periphere und zentrale Atemlähmung, da dadurch Atemfunktionsstörungen ausgelöst werden können, die innerhalb weniger Minuten zum Tod führen.

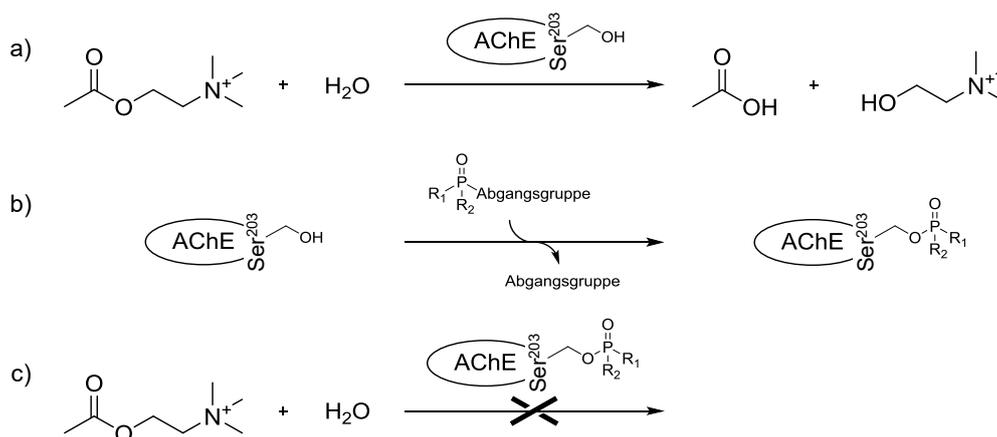


Abbildung 2: Wirkmechanismus phosphororganischer Verbindungen: a) Hydrolytischer Abbau von Acetylcholin (ACh) durch das Enzym Acetylcholinesterase (AChE) in Essigsäure und Cholin, b) Phosphorylierung der AChE durch phosphororganische Verbindungen an Ser<sup>203</sup> im aktiven Zentrum, c) Funktionsverlust der AChE nach Phosphorylierung mit Anhäufung von ACh im synaptischen Spalt.

### 1.1.3 Therapie bei Vergiftungen

Zur Behandlung einer akuten Vergiftung mit phosphororganischen Verbindungen werden neben allgemeinen Maßnahmen zur Aufrechterhaltung der Vitalfunktionen (zum Beispiel kardiopulmonale Reanimation) und Reduktion der weiteren Giftaufnahme (zum Beispiel Magenentleerung, Magenspülung und Gabe von Aktivkohle bei Verschlucken sowie Entfernung kontaminierter Kleidung und Dekontamination der Haut bei dermalen Exposition) die folgenden Maßnahmen empfohlen [18]:

- Gabe von Diazepam als Antikonvulsivum
- Gabe von Atropin zur Antagonisierung der Überstimulation muskarinischer ACh-Rezeptoren
- Reaktivierung der gehemmten AChE durch Gabe von Oximen

Oxime wie Pralidoxim oder Obidoxim sollen durch einen nukleophilen Angriff den an Ser<sup>203</sup> gebundenen Phosphyl-Rest ablösen und dadurch die Aktivität der gehemmten AChE wiederherstellen (Abbildung 3a). Die Oximgabe muss dabei möglichst frühzeitig nach einer Vergiftung erfolgen, da durch hydrolytische Abspaltung von Alkoxy-Resten („Alterung“, englisch „aging“) am phosphylierten Ser<sup>203</sup> eine Reaktivierung verhindert wird [19] (Abbildung 3b). Vor allem Vergiftungen mit Soman sind problematisch, da die Alterung innerhalb weniger Minuten abläuft und eine Oximtherapie daher nicht ausreichend schnell eingeleitet werden kann [20].

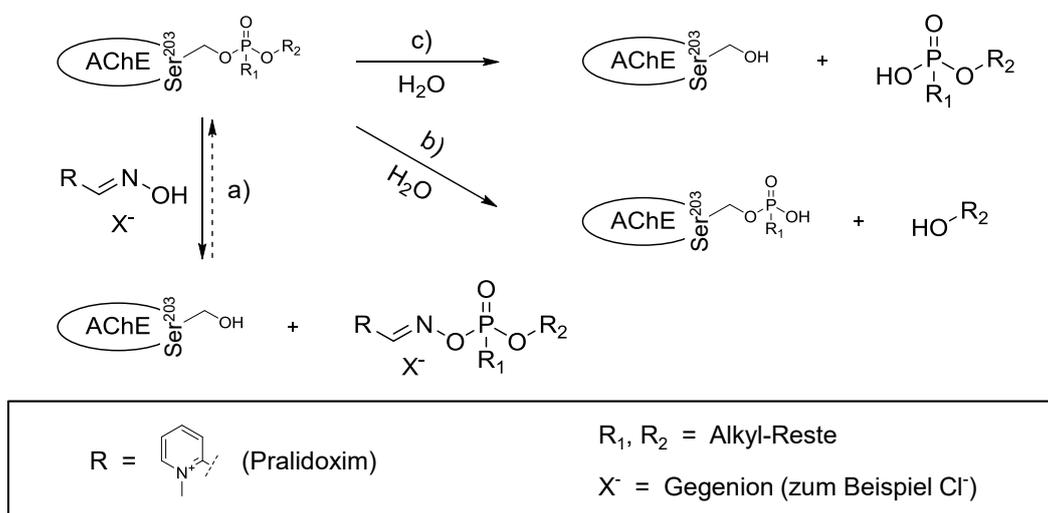


Abbildung 3: Mögliche Reaktionen am aktiven Zentrum der durch phosphororganische Verbindungen gehemmten AChE nach [20]: a) Oxim-induzierte Reaktivierung, b) Hydrolytische Abspaltung eines Alkoxy-Restes („Alterung“), c) Spontane Reaktivierung durch hydrolytische Spaltung in das freie Enzym und eine phosphororganische Verbindung.

Weitere Probleme der Oxime sind zudem ihre häufig unzureichende Penetrationsfähigkeit durch die Blut-Hirn-Schranke sowie die Tatsache, dass es selbst nach mehreren Jahrzehnten intensiver Forschung auch heute noch keine breitwirksamen Verbindungen gibt [21]. Daher werden laufend neue Therapieoptionen gesucht, wobei vor allem Verbindungen, die Pestizide und Nervenkampfstoffe vor ihrer Interaktion mit der AChE abfangen („Scavenger“), aktuell Gegenstand intensiver Forschung sind [22]. Zudem ist die Hemmung der Überstimulation nikotinischer ACh-Rezeptoren in den letzten Jahren als neuer Therapieansatz in den Vordergrund getreten, da dieser Aspekt einer Vergiftung mit phosphororganischen Verbindungen lange Zeit unberücksichtigt geblieben ist [23, 24].

## 1.2 Verifikationsanalytik

### 1.2.1 Rechtliche und politische Bedeutung

Nach der erstmals großflächigen Anwendung im Zuge des Ersten Weltkriegs kam es während des 20. Jahrhunderts zu zahlreichen weiteren Ereignissen, bei denen chemische Kampfstoffe ein- oder freigesetzt wurden [5]. Abgesehen von zwischenstaatlichen Konflikten (zum Beispiel 1980–88 Erster Golfkrieg) [25] spielten chemische Kampfstoffe vor allem gegen Ende des Jahrhunderts auch eine Rolle bei Terroranschlägen durch nichtstaatliche Akteure (zum Beispiel Anschläge der Aum Shinrikyo Sekte 1994 in Matsumoto und 1995 in Tokyo) [26].

Basierend auf diesen Erfahrungen und den daraus resultierenden Bemühungen, den Einsatz chemischer Kampfstoffe völkerrechtlich zu verbieten, trat am 29. April 1997 das Chemiewaffenübereinkommen (CWÜ) in Kraft [27]. Im Unterschied zu früheren Abkommen (zum Beispiel 1899/1907 Haager Friedenskonferenzen, 1925 Genfer Protokoll) umfasst das CWÜ erstmalig nicht nur das Verbot der Anwendung, sondern auch der Entwicklung, Produktion und Lagerung chemischer Waffen. Zur Überwachung des CWÜ nahm zeitgleich die Organisation für das Verbot Chemischer Waffen (OVCW, englisch Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons, OPCW) ihre Arbeit auf [28].

Im Einzelnen bestehen die Hauptaufgaben der OVCW dabei in der Überwachung der Vernichtung von Altbeständen chemischer Kampfstoffe sowie in der Durchführung von regelmäßigen Kontrollen, um ein erneutes Auftreten derartiger Verbindungen zu verhindern. Daneben unterstützt die OVCW ihre Mitgliedstaaten bei der Abwehr von Angriffen mit chemischen Waffen und berät sie zum Beispiel bei der medizinischen Behandlung von Vergiftungsopfern. Von besonderer Bedeutung ist hierbei die Beteiligung der OVCW an der Verifikation einer vermeintlichen Anwendung von chemischen Kampfstoffen im Rahmen von Fact-Finding Missionen (FFM) der Vereinten Nationen [29]. Neben der Befragung von potentiellen Opfern, Augenzeugen sowie medizinischem Personal durch

geschulte Inspektoren spielt vor allem dieahme von Umwelt- und biomedizinischen Proben eine entscheidende Rolle. Diese werden umgehend an das Netzwerk der sogenannten designierten Laboratorien der OVCW weitergeleitet und dort auf die Anwesenheit chemischer Kampfstoffe, entsprechender Abbauprodukte oder charakteristischer Biomarker untersucht. Auf diese Weise konnte im Jahr 2013 der Einsatz chemischer Kampfstoffe im Rahmen des anhaltenden syrischen Bürgerkriegs zweifelsfrei nachgewiesen werden [30, 31].

In Anerkennung ihrer anhaltenden Bemühungen um die globale chemische Entmilitarisierung sowie die Förderung der friedlichen Nutzung der chemischen Industrie wurde der OVCW 2013 der Friedensnobelpreis verliehen [32].

### 1.2.2 Biomarker einer Vergiftung mit phosphororganischen Verbindungen

Zum eindeutigen Nachweis einer Vergiftung mit phosphororganischen Verbindungen kommen in der forensischen Analytik sogenannte Biomarker zum Einsatz. Hierbei handelt es sich definitionsgemäß um Eigenschaften, die objektiv gemessen und evaluiert werden können und unter anderem als Indikatoren für pharmakologische Reaktionen auf therapeutische Interventionen dienen [33]. Da jedes Therapeutikum neben erwünschten auch unerwünschte (toxische) Wirkungen haben kann, lässt sich diese Definition auch auf toxische Verbindungen im Allgemeinen und phosphororganische Verbindungen im Speziellen übertragen. Dann können Biomarker als Eigenschaften definiert werden, die als Indikatoren für eine Exposition dienen.

Im Folgenden sollen wichtige Biomarker einer Vergiftung mit phosphororganischen Verbindungen anhand des Nervenkampfstoffs VX näher erläutert werden.

Die verminderte Aktivität der beiden Enzyme AChE und der verwandten Butyrylcholinesterase (BChE) im Blut kann einen ersten Hinweis auf eine Vergiftung mit phosphororganischen Verbindungen liefern. Mithilfe einfacher photometrischer Schnellmethoden basierend auf dem Ellman-Assay kann die Enzymaktivität bestimmt und als diagnostischer Biomarker herangezogen werden [34, 35]. Dieses Vorgehen erlaubt allerdings nicht die Identifizierung der aufgenommenen phosphororganischen Verbindung, obwohl dies sowohl aus forensisch-toxikologischer als auch therapeutischer Sicht von großer Bedeutung ist [36, 37].

Der eindeutige Nachweis einer toxischen Verbindung ist nur durch komplexere instrumentell-analytische Verfahren möglich, unter denen sich die Kopplung von Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie (LC-MS) durchgesetzt hat und inzwischen standardmäßig zum Einsatz kommt [6, 38].

Abgesehen von der direkten Detektion der intakten phosphororganischen Verbindung spielen vor allem ihre Biotransformationsprodukte eine wichtige Rolle. So führt beispielsweise die Hydrolyse von VX zur Bildung von Ethylmethylphosphonsäure (EMPS), die ihrerseits zur Methylphosphonsäure (MPS) abgebaut wird (Tabelle 2a). Gleichzeitig wird die Abgangsgruppe Diisopropylaminoethanthiol (DPAET) freigesetzt und durch eine Methyltransferase in Diisopropylaminoethylmethylsulfid (DPAEMS) umgewandelt [39] (Tabelle 2b). Als Besonderheit von VX besteht die Möglichkeit der Bildung eines weiteren Hydrolyseprodukts (EA-2192), das aufgrund der verbliebenen Abgangsgruppe nach wie vor zur Hemmung der AChE in der Lage ist und daher einen toxischen Metaboliten darstellt [40] (Tabelle 2c).

Daneben werden zunehmend kovalente Addukte zwischen phosphororganischen Verbindungen und körpereigenen Proteinen zum Nachweis einer Vergiftung herangezogen. Der Vorteil dieser Biomarker im Vergleich zu niedermolekularen Biotransformationsprodukten liegt in der deutlich längeren Halbwertszeit, sodass eine Vergiftung nicht nur Stunden bis Tage, sondern meist noch Tage bis Wochen nach der vermeintlichen Exposition nachgewiesen werden kann [6, 8, 31].

Bewährte Zielproteine sind das Enzym BChE sowie humanes Serumalbumin (HSA), die beide über Halbwertszeiten zwischen zwei und drei Wochen (BChE: 10–16 Tage, HSA: 20 Tage) [41] verfügen und aus Vollblut gewonnen werden können. Biomarker einer Vergiftung mit phosphororganischen Verbindungen entstehen dabei durch Phosphorylierung bestimmter nukleophiler Aminosäure-Reste und können nach enzymatischer Spaltung in kleinere Bruchstücke mittels LC-MS detektiert werden. So entsteht nach Pepsinspaltung des kovalenten Addukts zwischen phosphororganischen Verbindungen und der BChE ein Nonapeptid (FGES<sup>198</sup>AGAAS), das an Ser<sup>198</sup> phosphoryliert ist [42–44] (Tabelle 2d). HSA hingegen wird durch phosphororganische Verbindungen an mehreren Tyrosin-Resten phosphoryliert, unter denen Tyr<sup>411</sup> die höchste Reaktivität aufweist [45]. Durch Pronasespaltung werden einzelne phosphorylierte Tyrosine freigesetzt und können ebenfalls detektiert werden [46–48] (Tabelle 2e).

Tabelle 2: Wichtige Biomarker zum Nachweis einer Vergiftung mit dem Nervenkampfstoff VX.

		Biomarker	
	Biotransformation	a)	 <chem>CCOP(=O)(O)OCC &gt;&gt; CCOP(=O)(O)O</chem> EMPS → Hydrolyse → MPS
		b)	 <chem>CC(C)NCCS &gt;&gt; CC(C)NCCS</chem> DPAET → Thiol S-methyltransferase → DPAEMS
		c)	 EA-2192
 VX	Adduktbildung	d)	 BChE-Ser <sup>198</sup> + VX → Addukt → Alterung → BChE-Ser <sup>198</sup> -P(=O)(OH)OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> → Pepsin → FGES <sup>198</sup> AGAAS
		e)	 HSA-Tyr + VX → Addukt → Pronase → Y

Neben Biotransformationsprodukten (a–c) kommen zunehmend kovalente Addukte mit körpereigenen Proteinen (d–e) zum Einsatz. EMPS: Ethylmethylphosphonsäure, MPS: Methylphosphonsäure, DPAET: Diisopropylaminoethanthiol, DPAEMS: Diisopropylaminoethylmethylsulfid, EA-2192: toxischer Metabolit von VX, BChE: Butyrylcholinesterase, HSA: humanes Serumalbumin.

## 2 Zielsetzung

Die Verifikation einer vermuteten Exposition gegenüber phosphororganischen Verbindungen einschließlich der eindeutigen Identifizierung der betreffenden Substanz stellt nach wie vor eine Herausforderung für die forensische Analytik dar. Langzeit-Biomarker, die durch Phosphorylierung nukleophiler Aminosäure-Reste in körpereigenen Proteinen gebildet werden, lassen nicht immer die Identität der toxischen Verbindung erkennen. Dies rührt daher, dass die große Vielfalt phosphororganischer Nervenkampfstoffe und Pestizide weniger in der Variabilität des Phosphyl-Restes als vielmehr der Abgangsgruppe begründet liegt [2]. So liefern beispielsweise die drei Pestizide Malaoxon, Oxydemeton-*S*-methyl und Ome thoat identische HSA-Tyrosin-Addukte (*O,O*-Dimethylphosphoryl-Rest), die bei alleiniger Betrachtung keine eindeutige Identifizierung des Pestizids erlauben [48]. Hinzu kommt, dass vor allem bei Nervenkampfstoffen zwar initial differenzierbare BChE-Serin-Addukte

gebildet werden, diese durch Alterung aber ihren charakteristischen Alkoxy-Substituenten und damit ihren Informationsgehalt verlieren. Auf diese Weise entstehen durch Alterung der BChE-Serin-Addukte von Sarin, Soman, Cyclosarin, VX, CVX und RVX stets identische Nonapeptide, die alle an Ser<sup>198</sup> einen Methylphosphonyl-Rest tragen [44]. Eine eindeutige Identifizierung der aufgenommenen phosphororganischen Verbindung ist auch in diesem Fall retrospektiv nicht mehr möglich.

Eine mögliche Lösung für diese Problematik stellt die simultane Detektion von Biomarkern dar, die sowohl Auskunft über den Phosphyl-Rest als auch über die Abgangsgruppe geben. Während für bestimmte phosphororganische Verbindungen Methoden zur Detektion der freien Abgangsgruppe oder eines davon abgeleiteten Biotransformationsprodukts in der Literatur beschrieben sind (Chlorpyrifos: [49, 50]; Methylparathion: [51, 52]; VX: [39]), fehlen derartige Methoden für kovalente Addukte mit körpereigenen Proteinen (Langzeit-Biomarker). Lediglich Noort et al. spekulierten über die Möglichkeit der Bildung von Disulfid-Addukten zwischen der thiolhaltigen Abgangsgruppe des Pestizids Malathion und dem einzigen nicht verbrückten Cystein in HSA (Cys<sup>34</sup>) [53]. Experimentelle Daten zur Untermauerung dieser Hypothese wurden allerdings nicht präsentiert.

Daher sollte im Rahmen der vorliegenden Dissertation die Möglichkeit der Bildung von Disulfid-Addukten als neuartige Klasse von potentiellen Langzeit-Biomarkern sowohl mit HSA als auch mit anderen Plasmakomponenten (zum Beispiel freien Aminosäuren) untersucht werden. Zusätzlich sollten diese Disulfid-Addukte im Rahmen einer möglichst einfachen Probenvorbereitung zusammen mit bereits bestehenden Biomarkern (HSA-Tyrosin-Addukte) simultan detektierbar sein, um eine eindeutige Identifizierung der betreffenden phosphororganischen Verbindung zu ermöglichen. Da alle V-Stoffe (VX, CVX, RVX) über eine thiolhaltige Abgangsgruppe verfügen (Tabelle 1), wurden diese Verbindungen als Repräsentanten der Klasse der Nervenkampfstoffe in die Untersuchungen mit einbezogen. Als Vertreter für die sehr umfangreiche Klasse der Pestizide mit thiolhaltiger Abgangsgruppe wurden die Verbindung Oxydemeton-*S*-methyl (ODM) sowie deren Hauptmetabolit Demeton-*S*-methyl sulfon (DSMS) ausgewählt, da auf klinische Proben einer Vergiftung mit der Pestizidzubereitung Metasystox<sup>®</sup> (ODM) zurückgegriffen werden konnte. Dadurch ließ sich die Eignung der entwickelten Methodik unmittelbar anhand von Proben eines realen Vergiftungsszenarios beurteilen.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in den folgenden vier Originalarbeiten im Einzelnen dargestellt.

## 3 Veröffentlichungen

### 3.1 Erste Veröffentlichung

#### **Modification of human serum albumin by the nerve agent VX: Microbore liquid chromatography/electrospray ionization high-resolution time-of-flight tandem mass spectrometry method for detection of phosphorylated tyrosine and novel cysteine containing disulfide adducts**

A. Kranawetvogl, F. Worek, H. Thiermann, H. John. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 30:2191–2200, 2016.

DOI: 10.1002/rcm.7707

Die Möglichkeit der Bildung von Disulfid-Addukten zwischen HSA und thiolhaltigen Abgangsgruppen phosphororganischer Cholinesteraseinhibitoren sollte zunächst exemplarisch anhand des V-Typ Nervenkampfstoffs VX (Tabelle 1) untersucht werden.

Nach Inkubation von gereinigtem HSA und Heparin-Plasma mit VX bei 37 °C und Abtrennung von nicht umgesetztem VX wurde der Reaktionsansatz mithilfe von Pronase (EC 3.4.24.4) enzymatisch proteolysiert. Die dabei gebildeten niedermolekularen Spaltprodukte (Oligopeptide, einzelne Aminosäuren) wurden durch Ultrafiltration von Polypeptiden und verbliebener Pronase abgetrennt und dadurch aufgereinigt. Aufgrund der konkreten Erwartungshaltung der Bildung von Disulfid-Addukten am einzigen nicht verbrückten Cystein in HSA (Cys<sup>34</sup>) [53] und der bekannten Freisetzung von Cys<sup>34</sup>Pro Dipeptiden aus HSA durch Pronasespaltung [54, 55] wurde gezielt nach dem CysPro-Dipeptid-Disulfid-Addukt mit der Abgangsgruppe von VX (DPAET-CP) gesucht („targeted analysis“). Hierzu wurde die aufgereinigte Messlösung zunächst mittels Flüssigchromatographie bei niedrigen Flüssen („microbore liquid chromatography“) aufgetrennt, um direkt im Anschluss die einzelnen Bestandteile durch hochauflösende Tandem-Flugzeitmassenspektrometrie („high-resolution time-of-flight tandem mass spectrometry“) detektieren zu können. Durch Vergleich der theoretischen exakten mit der tatsächlich gemessenen Masse der bei der Fragmentierung gebildeten Produktionen konnte die Bildung von DPAET-CP eindeutig nachgewiesen werden (akzeptable Massenabweichung  $\Delta m/z < 10$  ppm, maximale gemessene Massenabweichung  $\Delta m/z < 8$  ppm). Zudem konnte ein zu DPAET-CP massengleiches Disulfid-Addukt detektiert werden, das sich jedoch deutlich in seinem chromatographischen Verhalten von DPAET-CP unterschied. Aufgrund der zu DPAET-CP sehr ähnlichen Fragmentierung wurde auf die Bildung von

HSA-VX-Disulfid-Addukten an einer anderen Position als Cys<sup>34</sup> geschlossen und auf die Möglichkeit der pronasevermittelten Freisetzung von PC-DPAET nach Adduktbildung an Cys<sup>448</sup> oder Cys<sup>487</sup> verwiesen. Der genaue Ursprung dieses zusätzlichen Disulfid-Addukts konnte aufgrund fehlenden Peptidreferenzmaterials jedoch nicht abschließend geklärt werden. Um die Struktur der phosphororganischen Verbindung eindeutig bestimmen zu können, wurde das unter den gewählten Bedingungen ebenfalls detektierbare HSA-VX-Tyrosin-Addukt (*O*-Ethylmethylphosphonotyrosin, Y-VX) in die Methode miteinbezogen.

Um die Zuverlässigkeit der entwickelten Methode charakterisieren zu können, wurde die Stabilität der Disulfid- und Tyrosin-Addukte unter Laborbedingungen bei wiederholtem Einfrieren (-20 °C) und Auftauen von Plasmaproben („freeze-thaw-stability“) sowie bei Lagerung der aufgearbeiteten Messlösung im Autosampler (15 °C) untersucht. In beiden Fällen wurde kein Abbau der Analyten beobachtet, sodass eine Fehlinterpretation von Analyseergebnissen auch bei wiederholtem Auftauen eingefrorener Proben sowie bei sehr großem Probenaufkommen und damit langer Lagerung im Autosampler ausgeschlossen werden kann.

Die Bildung von Disulfid- und Tyrosin-Addukten in Abhängigkeit von der im Inkubationsansatz vorliegenden Menge an VX wurde in einem breiten Konzentrationsbereich von 117,6 nM (31,4 ng/mL) bis 11,8 mM (3,1 mg/mL) untersucht. Während das vermutete PC-DPAET einen linearen Anstieg der Signalintensität nahezu über den gesamten Konzentrationsbereich zeigte, ergab sich für DPAET-CP und Y-VX ein linearer Zusammenhang nur für VX-Konzentrationen  $\leq 30 \mu\text{M}$  (8,0  $\mu\text{g/mL}$ ). Darüber zeigten diese beiden Addukte ein exakt gegenläufiges Verhalten (DPAET-CP: Kurvenabflachung, Y-VX: Kurvenanstieg). Im ersten Fall deutete diese Beobachtung auf eine quantitative Umsetzung des freien Thiols an Position 34 durch einen großen molaren Überschuss an VX hin, während im zweiten Fall die Bildung von Y-VX aus bis zu 7 unterschiedlich reaktiven Tyrosin-Resten als Erklärung für den starken Anstieg der Adduktausbeute herangezogen wurde.

Abschließend sollte die Empfindlichkeit der entwickelten Methode durch Bestimmung der geringsten VX-Konzentration, die anhand von Disulfid- und Tyrosin-Addukten gerade noch nachweisbar war (Nachweisgrenze, englisch „limit of detection“, LOD), untersucht werden. Dabei kamen die international anerkannten Kriterien der OVCW zum Nachweis von Analyten in forensischen Proben zum Einsatz, wobei das vermutete PC-DPAET aufgrund seiner vergleichsweise geringen Signalintensität nicht berücksichtigt wurde. Für den Nachweis von VX anhand von DPAET-CP und Y-VX wurden hingegen toxikologisch relevante LOD-Werte erhalten, die für DPAET-CP (LOD: 1,2  $\mu\text{M}$  oder 0,3  $\mu\text{g/mL}$  VX) etwa 5-fach niedriger waren als für Y-VX (LOD: 5,9  $\mu\text{M}$  oder 1,6  $\mu\text{g/mL}$  VX). Damit konnte der Nutzen der beschriebenen Disulfid-Addukte für den empfindlichen Nachweis des Nervenkampfstoffs VX in *in vitro* Proben belegt werden.

Hinweis

An dieser Stelle wird auf die Wiedergabe der vorgenannten Publikation verzichtet, da diese bereits in einer wissenschaftlichen Fachzeitschrift veröffentlicht worden ist.

Stattdessen wird im Einklang mit § 8 Absatz 5 Satz 2 der Promotionsordnung für die Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München vom 1. Juni 1983 in der Fassung der elften Änderungssatzung vom 15. September 2016 auf die zugehörige Fundstelle verwiesen:

<https://doi.org/10.1002/rcm.7707>

## 3.2 Zweite Veröffentlichung

### 3.2.1 Artikel

#### Identification of novel disulfide adducts between the thiol containing leaving group of the nerve agent VX and cysteine containing tripeptides derived from human serum albumin

A. Kranawetvogl, J. Küppers, M. Gütschow, F. Worek, H. Thiermann, P. W. Elsinghorst, H. John. *Drug Testing and Analysis*, 9:1192–1203, 2017.

DOI: 10.1002/dta.2144

Basierend auf den vorangegangenen Untersuchungen sollte im Folgenden die Identität der massenspektrometrisch nachgewiesenen HSA-VX-Disulfid-Addukte auch chromatographisch bestätigt werden. Hierzu mussten zunächst CysPro und ProCys Dipeptide eigens synthetisiert und mit geeigneten Schutzgruppen versehen werden, um bei der anschließenden Umsetzung mit VX eine Adduktbildung nur an der freien Thiolgruppe des Cystein-Restes zuzulassen. Nach Abspaltung der Schutzgruppen wurden auf diese Weise die beiden Dipeptid-Disulfid-Addukte DPAET-CP und PC-DPAET als Referenzmaterialien erhalten.

Bei chromatographischen Trennverfahren kann die Identität einer detektierten Verbindung durch Koinjektion von definiertem Referenzmaterial eindeutig bestimmt werden. Dabei wird eine Probe zunächst nativ und anschließend erneut nach Zusatz von Referenzmaterial analysiert. Entspricht das zugesetzte Referenzmaterial strukturell dem in der Probe detektierten Analyten, tritt nur ein Peak bei der dem Analyten zugeordneten Retentionszeit auf. Die Fläche dieses Peaks im Chromatogramm nach Zusatz des Referenzmaterials ist zudem größer als in der nativen Probe. Sind Analyt und Referenzmaterial strukturell nicht identisch, ist ein zusätzlicher Peak bei einer anderen Retentionszeit detektierbar.

Die Koinjektion der synthetisierten DPAET-CP und PC-DPAET Referenzmaterialien bei einer nach Pronasespaltung von VX-inkubiertem gereinigtem HSA erhaltenen Probe bestätigte zweifelsfrei die Identität der postulierten DPAET-CP Disulfid-Addukte. Im Falle von PC-DPAET trat jedoch ein zusätzlicher Peak mit deutlich geringerer Retentionszeit auf. Dennoch konnte durch Vergleich der nach Fragmentierung erhaltenen Produktionspektren bestätigt werden, dass es sich bei der ursprünglich im Massenspektrometer detektierten Verbindung um PC-DPAET handelte (maximale gemessene Massenabweichung

$\Delta m/z < 5$  ppm). Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen bestand darin, dass im Zuge der Ionisierung der Analyten in der Ionenquelle unmittelbar nach der chromatographischen Trennung größere Verbindungen in kleinere zerfallen können (englisch „in-source decay“, ISD), noch bevor die Detektion im Massenspektrometer erfolgt. Dies führt dazu, dass kleinere Verbindungen bei ungewöhnlich hohen Retentionszeiten detektierbar sind. Daher wurde nach Absuchen der Aminosäuresequenz von HSA gezielt nach möglichen Tripeptiden gesucht, die durch ISD das Dipeptid ProCys freisetzen können. Dies erlaubte schließlich die Detektion des MetProCys<sup>448</sup>-Tripeptid-Disulfid-Addukts (MPC-DPAET), das die gleiche Retentionszeit zeigte wie das ursprünglich postulierte PC-DPAET. Dadurch konnte schließlich die Detektion dieser Verbindung in den untersuchten Proben erklärt werden.

Bei genauerer Betrachtung des Peaks von MPC-DPAET fiel zudem auf, dass neben dem Hauptpeak ein weiterer, deutlich kleinerer Peak mit geringfügig höherer Retentionszeit detektierbar war. Der Vergleich der hochaufgelösten Produktions-Spektren dieser beiden Peaks zeigte, dass es sich dabei um zwei unterschiedliche Verbindungen mit nahezu identischer Molekülmasse handelte. Während MPC-DPAET für den Hauptpeak verantwortlich gemacht wurde (maximale gemessene Massenabweichung  $\Delta m/z < 5$  ppm), war die Identität der nahezu isobaren Verbindung zunächst unklar. Da jedoch auch diese Verbindung die für DPAET-Cystein-Disulfid-Addukte typischen Produktions-Spektren zeigte, konnte nach erneutem Absuchen der Aminosäuresequenz von HSA in Verbindung mit der Berechnung der Molekülmassen möglicher weiterer Tripeptid-Disulfid-Addukte das AspIleCys<sup>514</sup>-Tripeptid-Disulfid-Addukt (DIC-DPAET) identifiziert werden.

Analog zur ersten Veröffentlichung konnte auch bei längerer Lagerung des neu identifizierten MPC-DPAET Disulfid-Addukts in der aufgearbeiteten Messlösung im Autosampler kein Abbau beobachtet werden. Die Bestimmung des LOD für VX mithilfe von MPC-DPAET anhand der OVCW-Kriterien ergab eine VX-Konzentration von 5,9  $\mu\text{M}$  (1,6  $\mu\text{g/mL}$ ). Dieser Wert entspricht dem für die Tyrosin-Addukte (Y-VX) in der ersten Veröffentlichung ermittelten LOD, wodurch der Nutzen von MPC-DPAET für den empfindlichen Nachweis des Nervenkampfstoffs VX in *in vitro* Proben belegt werden konnte. Aufgrund der deutlich geringeren Signalintensität im Vergleich zu MPC-DPAET wurde DIC-DPAET nicht in diese Untersuchungen miteinbezogen.

Abschließend wurden auf der Grundlage der in den ersten beiden Veröffentlichungen gewonnenen Erkenntnisse mögliche Mechanismen hinsichtlich der Bildung von HSA-VX-Disulfid-Addukten diskutiert. Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen kommt dabei die größte Bedeutung zu. Zudem wurde anhand von Berechnungen am 3D-Modell von HSA die Mikroumgebung relevanter Aminosäuren in besonderem Maße berücksichtigt.

Hinweis

An dieser Stelle wird auf die Wiedergabe der vorgenannten Publikation verzichtet, da diese bereits in einer wissenschaftlichen Fachzeitschrift veröffentlicht worden ist.

Stattdessen wird im Einklang mit § 8 Absatz 5 Satz 2 der Promotionsordnung für die Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München vom 1. Juni 1983 in der Fassung der elften Änderungssatzung vom 15. September 2016 auf die zugehörige Fundstelle verwiesen:

<https://doi.org/10.1002/dta.2144>

### 3.2.2 Supplement

#### Content

General methods.....	S1
Syntheses.....	S1–S3
<b>Figure S1.</b> Synthesis of Boc-( <i>R</i> )-cysteinyl-( <i>S</i> )-proline <i>tert</i> -butyl ester ( <b>1</b> ). .....	S4
<b>Figure S2.</b> Synthesis of Boc-( <i>S</i> )-prolyl-( <i>R</i> )-cysteine <i>tert</i> -butyl ester ( <b>2</b> ). .....	S5

#### General methods

Thin-layer chromatography was carried out on Merck (Darmstadt, Germany) aluminum sheets, silica gel 60 F254 with detection by UV light at 254 nm and preparative column chromatography on Merck silica gel 60 (70–230 mesh). Melting points (mp) were determined on a Büchi (Essen, Germany) 510 oil bath apparatus. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz) and <sup>13</sup>C NMR (126 MHz) spectra were recorded on a Bruker Avance DRX 500 and <sup>1</sup>H NMR (600 MHz) and <sup>13</sup>C NMR (151 MHz) spectra on a Bruker Avance III 600 NMR spectrometer. Chemical shifts  $\delta$  are given in ppm referring to the signal center using the solvent peaks (DMSO-*d*<sub>6</sub>) for reference, 2.49/39.7 ppm. LC-MS analyses were carried out using an API2000 (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) mass spectrometer coupled to an Agilent (Santa Clara, CA, USA) 1100 LC system via an electrospray ionization (ESI) interface. A Phenomenex Luna C18 column (50 × 2.0 mm I.D., 3  $\mu$ m, Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) was used and gradient elution was applied with solvent A (H<sub>2</sub>O) and solvent B (MeOH): t [min]/B [%]: 0/10, 10/100, 20/100. Purity of the compounds was determined using the diode array detector (DAD) of the LC-MS instrument between 200 and 400 nm. HRMS were recorded on a microTOF-Q (Bruker, Köln, Germany) mass spectrometer connected to a Dionex (Thermo Scientific, Braunschweig, Germany) Ultimate 3000 LC via an ESI interface using a Nucleodur C18 Gravity column (50 × 2.0 mm I.D., 3  $\mu$ m, Macherey-Nagel, Düren, Germany).

#### Syntheses

##### *Bis*-Boc-(*R,R*)-cystinyl-(*S*)-proline *tert*-butyl ester (**5**)

L-Proline *tert*-butyl ester hydrochloride (**4**) (0.436 g, 2.1 mmol) was treated with di-Boc-L-cysteine (**3**) (0.440 g, 1 mmol), 2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU, 0.796 g, 2.1 mmol), 1-hydroxybenzotriazole monohydrate (HOBt × H<sub>2</sub>O, 0.321 g, 2.1 mmol) and *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA, 0.517 g,

S1

4.0 mmol) in a mixture of dry dichloromethane (25 mL) and dry THF (25 mL) at room temperature for 2 h. The solvent was removed in vacuo, the resulting residue redissolved in ethyl acetate (30 mL) and washed with 10% citric acid (3 × 30 mL), 10% sodium bicarbonate (3 × 30 mL) and brine (3 × 30 mL). The organic layer was dried using sodium sulfate, filtered and evaporated to dryness. Purification was performed by preparative chromatography (ethyl acetate/petroleum ether 50/50 v/v) providing compound (**5**) as a white solid (0.660 g, 0.88 mmol, 88% yield); mp 56–59 °C; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.36 (s, 36H), 1.73–1.83 (m, 2H), 1.93 (quint, *J* = 6.8 Hz, 4H), 2.10–2.20 (m, 2H), 2.82 (dd, *J* = 13.8, 9.6 Hz, 2H), 2.95 (dd, *J* = 13.6, 4.2 Hz, 2H), 3.68–3.52 (m, 4H), 4.15–4.20 (m, 2H), 4.45–4.52 (m, 2H), 7.19 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 24.63, 27.66, 28.27, 28.61, 40.87, 46.42, 51.67, 59.69, 78.42, 80.42, 155.43, 168.71, 170.76; LC-MS, 96% purity, [M+H]<sup>+</sup> *m/z* 747.6.

Boc-(*R*)-cysteinyl-(*S*)-proline *tert*-butyl ester (**1**)

*Bis*-Boc-(*R,R*)-cystinyl-(*S*)-proline *tert*-butyl ester (**5**) (0.640 g, 0.86 mmol) was treated with Cleland's reagent (1,4-dithiothreitol, DTT) (0.528 g, 3.4 mmol) and triethylamine (0.347 g, 3.4 mmol) in degassed dichloromethane (40 mL) under an argon atmosphere for 24 h at room temperature. Subsequently, the solvent was removed in vacuo, the residue redissolved in argon-saturated ethyl acetate (40 mL) and washed with degassed 10% citric acid (3 × 20 mL) and degassed H<sub>2</sub>O (3 × 20 mL). The organic layer was dried using sodium sulfate, filtered and evaporated to dryness. Purification was achieved by preparative chromatography (degassed ethyl acetate/degassed petroleum ether 80/20 v/v to 70/30 v/v) providing Boc-(*R*)-cysteinyl-(*S*)-proline *tert*-butyl ester as a clear resin (0.446 g, 1.2 mmol, 70% yield); <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.37 (s, 18H), 1.75–1.83 (m, 1H), 1.87–1.95 (m, 2H), 2.10–2.18 (m, 1H), 2.35–2.42 (m, 1H), 2.50–2.59 (m, 1H), 2.71–2.79 (m, 1H), 3.58–3.64 (m, 2H), 4.14–4.19 (m, 1H), 4.25–4.30 (m, 1H), 7.08 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 24.94, 25.68, 28.06, 28.64, 29.06, 46.97, 55.31, 60.00, 78.75, 80.89, 155.70, 169.26, 171.36; LC-MS, 100% purity, [M+H]<sup>+</sup> *m/z* 375.1; HR MS, calcd. for C<sub>17</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S: [M+H]<sup>+</sup> *m/z* 375.1948, found: 375.1955.

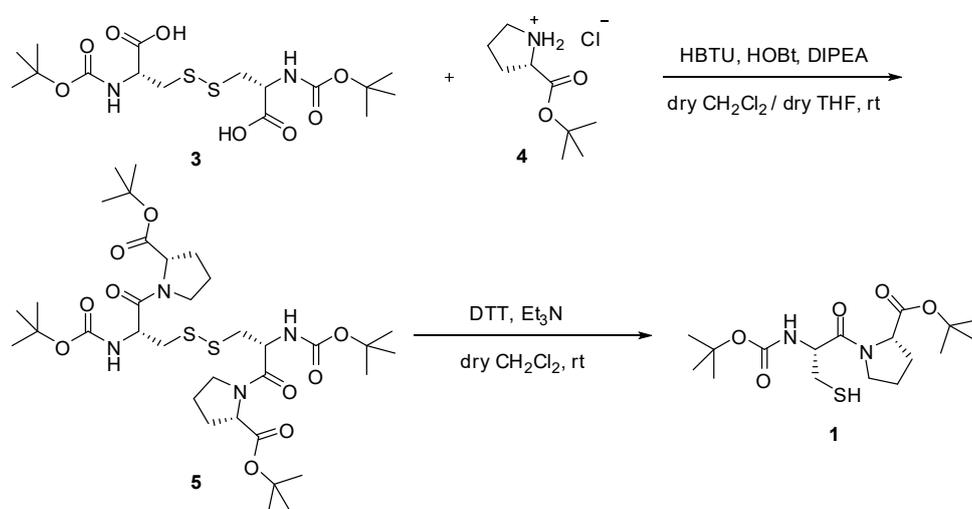
*Bis*-Boc-(*S*)-prolyl-(*R,R*)-cystine *tert*-butyl ester (**8**)

L-cystine bis(*tert*-butyl ester) dihydrochloride (**6**) (0.425 g, 1.0 mmol) was treated with Boc-L-proline (**7**) (0.452 g, 2.1 mmol), 2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU, 0.796 g, 2.1 mmol), 1-hydroxybenzotriazole monohydrate

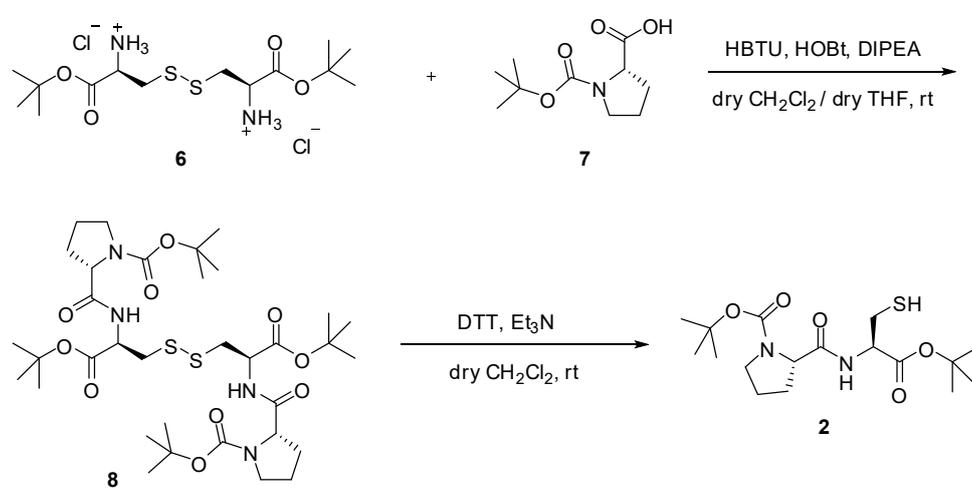
(HOBt  $\times$  H<sub>2</sub>O, 0.321 g, 2.1 mmol) and *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA, 0.517 g, 4.0 mmol) in a mixture of dry dichloromethane (25 mL) and dry THF (25 mL) at room temperature for 2 h. The solvent was removed in vacuo, the resulting residue redissolved in ethyl acetate (30 mL) and washed with 10% citric acid (3  $\times$  30 mL), 10% sodium bicarbonate (3  $\times$  30 mL) and brine (3  $\times$  30 mL). The organic layer was dried using sodium sulfate, filtered and evaporated to dryness. Purification was performed by preparative chromatography (ethyl acetate/petroleum ether 50/50 v/v) providing compound (**8**) as a colorless solid (0.602 g, 0.81 mmol, 81% yield); mp 127–130 °C; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  1.39, 1.32 (each s, 36H), 1.68–1.87 (m, 7H), 2.00–2.15 (m, 1H), 2.92–2.98 (m, 2H), 3.14 (dd, *J* = 13.4, 4.7 Hz, 2H), 3.21–3.28 (m, 2H), 3.35–3.40 (m, 2H), 4.04–4.18 (m, 2H), 4.33–4.50 (m, 2H), 8.13–8.24 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  23.06, 27.69, 28.13, 28.27, 31.08, 46.57, 51.87, 59.73, 78.61, 81.30, 153.49, 169.61, 172.66; LC-MS, 100% purity, [M+H]<sup>+</sup> *m/z* 747.6, [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> *m/z* 764.6.

#### Boc-(*S*)-prolyl-(*R*)-cysteine *tert*-butyl ester (**2**)

*Bis*-Boc-(*S*)-prolyl-(*R,R*)-cysteine *tert*-butyl ester (**8**) (0.602 g, 0.81 mmol) was reduced with DTT (0.497 g, 3.2 mmol) in the presence of triethylamine (0.326 g, 3.2 mmol) in degassed dichloromethane (35 mL) under an argon atmosphere for 24 h at room temperature. Subsequently, the solvent was removed in vacuo, the residue redissolved in argon-saturated ethyl acetate (35 mL) and washed with degassed 10% citric acid (3  $\times$  20 mL) and degassed H<sub>2</sub>O (3  $\times$  20 mL). The organic layer was dried using sodium sulfate, filtered and evaporated to dryness. The product was purified by preparative chromatography (degassed ethyl acetate/degassed petroleum ether 70/30 v/v) to yield Boc-(*S*)-prolyl-(*R*)-cysteine *tert*-butyl ester as a colorless solid (0.400 g, 1.1 mmol, 66% yield); mp 98–100 °C; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  1.40, 1.33 (each s, 18H), 1.72–1.84 (m, 3H), 2.05–2.14 (m, 1H), 2.35–2.43 (m, 1H), 2.72–2.86 (m, 2H), 3.25–3.30 (m, 1H), 3.35–3.41 (m, 1H), 4.13–4.20 (m, 1H), 4.25–4.33 (m, 1H), 8.12 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  25.65, 27.74, 28.15, 28.26, 31.10, 46.59, 55.06, 59.56, 78.60, 81.19, 153.46, 169.28, 172.64; LC-MS, 100% purity, [M+H]<sup>+</sup> *m/z* 375.1, [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> *m/z* 392.3; HR MS, calcd. for C<sub>17</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S: [M+H]<sup>+</sup> *m/z* 375.1948, found: 375.1934.



**Figure S1.** Synthesis of Boc-(*R*)-cysteinyl-(*S*)-proline *tert*-butyl ester (**1**).



**Figure S2.** Synthesis of Boc-(*S*)-prolyl-(*R*)-cysteine *tert*-butyl ester (**2**).

### 3.3 Dritte Veröffentlichung

#### 3.3.1 Artikel

#### **Bioanalytical verification of V-type nerve agent exposure: Simultaneous detection of phosphorylated tyrosines and cysteine-containing disulfide-adducts derived from human albumin**

A. Kranawetvogl, J. Küppers, M. Siegert, M. Gütschow, F. Worek, H. Thiermann, P. W. Elsinghorst, H. John. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410:1463–1474, 2018. DOI: 10.1007/s00216-017-0787-7

Ausgehend von den Erkenntnissen aus den vorangegangenen Untersuchungen sollte die Übertragbarkeit des Prinzips der Bildung von Disulfid-Addukten zwischen HSA und thiolhaltigen phosphororganischen Cholinesteraseinhibitoren anhand weiterer V-Typ Nervenkeimstoffe überprüft werden. Dabei kamen die strukturell mit VX nahe verwandten Verbindungen CVX und RVX zum Einsatz, die beide über die gleiche Abgangsgruppe (Diethylaminoethanthiol, DEAET) verfügen. Durch eine zu den ersten beiden Publikationen analoge analytische Vorgehensweise konnten sowohl das CysPro-Dipeptid-Disulfid-Addukt (DEAET-CP) als auch das MetProCys-Tripeptid-Disulfid-Addukt (MPC-DEAET) sowie das AspIleCys-Tripeptid-Disulfid-Addukt (DIC-DEAET) mit der Abgangsgruppe von CVX und RVX detektiert werden. Die korrespondierenden Tyrosin-Addukte (*O*-Butylmethylphosphonotyrosin, Y-CVX und *O*-(2-Methylpropyl)methylphosphonotyrosin, Y-RVX) konnten ebenfalls in die Methode integriert werden.

Zur abschließenden eindeutigen Bestätigung der Identität der Tripeptid-Disulfid-Addukte wurden analog zur zweiten Publikation geschützte MetProCys und AspIleCys Tripeptide synthetisiert, mit den Nervenkeimstoffen umgesetzt und schließlich entschützt, um definierte Referenzmaterialien für die Tripeptid-Disulfid-Addukte zu erhalten. Diese wurden für Koinjektions-Experimente eingesetzt, wodurch die Identität der Tripeptid-Disulfid-Addukte letztlich auch chromatographisch eindeutig bestätigt werden konnte.

Im Rahmen der Methodenoptimierung sollte die Probenvorbereitung hinsichtlich einer möglichst hohen Analytausbeute und damit einer möglichst geringen Nachweisgrenze angepasst werden. Hierzu wurde die Freisetzung der CysPro-Dipeptid- und MetProCys-Tripeptid-Disulfid-Addukte sowie der Tyrosin-Addukte im Rahmen der Pronasespaltung

von inkubiertem HSA in Abhängigkeit von der Proteolysezeit untersucht („Pronasekinetik“). Die unterschiedlichen Konzentrations-Zeit-Profile erlaubten dabei Rückschlüsse auf die Zugänglichkeit der einzelnen zur Adduktbildung befähigten Aminosäuren im HSA-Molekül, wobei Hinweise auf eine mögliche Änderung der Tertiärstruktur von HSA durch Öffnung von Disulfidbrücken erhalten wurden. Zudem konnte gezeigt werden, dass die bereits standardmäßig eingehaltene Proteolysezeit von 2 Stunden optimal war, um eine möglichst hohe Analytausbeute zu erhalten.

Um die Bildung von Disulfid- und Tyrosin-Addukten in einer komplexen Matrix wie humanem Plasma nachvollziehen zu können, wurde humanes Plasma *in vitro* mit VX versetzt und für mehrere Stunden bei 37 °C inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten wurden Aliquots dieses Reaktionsansatzes entnommen und auf ihren Gehalt an VX, der freien thiolhaltigen Abgangsgruppe (DPAET), dem durch Oxidation gebildeten Dimer von DPAET (Tetraisopropylcystamin, TiPC) sowie DPAET-CP, MPC-DPAET und Y-VX untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass VX bereits vor der Reaktion mit HSA oder anderen Plasmakomponenten einen gewissen Anteil an DPAET und TiPC enthält, was auf einen nicht vermeidbaren (hydrolytischen) Abbau selbst unter kontrollierten Lagerbedingungen zurückgeführt wurde. Durch Vergleich der ermittelten Konzentrations-Zeit-Profile konnte zudem der bekanntermaßen biphasische Abbau von VX in Plasma (schnelle initiale, langsame terminale Phase) hinsichtlich des langsamen terminalen Abbaus mit der Bildung von HSA-VX-Addukten korreliert werden. Daher wurde geschlussfolgert, dass HSA durch kovalente Reaktion am Abbau von VX in Plasma beteiligt ist. Der bereits in der zweiten Publikation postulierte Mechanismus der Bildung von Disulfid-Addukten durch Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen wurde erneut aufgegriffen und durch die ermittelten kinetischen Daten weiter untermauert.

In Analogie zu den ersten beiden Publikationen wurde schließlich die Empfindlichkeit der entwickelten Methode durch die Bestimmung der LODs für CVX und RVX anhand der beschriebenen Disulfid-Addukte (DEAET-CP, MPC-DEAET) sowie der jeweiligen Tyrosin-Addukte (Y-CVX, Y-RVX) untersucht. Die für CVX und RVX ermittelten Werte bewegten sich in der gleichen Größenordnung wie für VX und wurden sowohl diesen als auch einander vergleichend gegenübergestellt und tabellarisch zusammengefasst. Damit konnte ebenso wie für VX der Nutzen der beschriebenen Disulfid-Addukte für den empfindlichen Nachweis der Nervenkampfstoffe CVX und RVX in *in vitro* Proben belegt werden.

Hinweis

An dieser Stelle wird auf die Wiedergabe der vorgenannten Publikation verzichtet, da diese bereits in einer wissenschaftlichen Fachzeitschrift veröffentlicht worden ist.

Stattdessen wird im Einklang mit § 8 Absatz 5 Satz 2 der Promotionsordnung für die Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München vom 1. Juni 1983 in der Fassung der elften Änderungssatzung vom 15. September 2016 auf die zugehörige Fundstelle verwiesen:

<https://doi.org/10.1007/s00216-017-0787-7>

### 3.3.2 Supplement

#### Supplementary Text

In the present supplement the synthesis of Boc-MetProCys-O-*t*-Bu and Boc-Asp(*t*-Bu)IleCys-O-*t*-Bu tripeptide reference compounds is described in detail. Upon reaction with V-type nerve agents and subsequent deprotection the produced tripeptide disulfide-adducts were used in co-injection experiments for chromatographic confirmation of adduct identity. Moreover, MS/HR MS data are listed allowing for unambiguous identification of CVX- and RVX-derived tyrosine- and disulfide-adducts by comparing theoretical exact and measured masses.

#### Content

1. Materials and methods .....	S2
1.1 Syntheses .....	S2
1.2 Co-injection of MPC and DIC disulfide-adducts as reference compounds.....	S6
2. Results and discussion.....	S7
<b>Figure S1.</b> Synthesis of Boc-MetProCys-O- <i>t</i> -Bu ( <b>1</b> ) .....	S8
<b>Figure S2.</b> Synthesis of Boc-Asp( <i>t</i> -Bu)IleCys-O- <i>t</i> -Bu ( <b>2</b> ).....	S9
<b>Figure S3.</b> Confirmation of HSA-derived tripeptide disulfide-adducts of VX by $\mu$ LC-ESI MS/HR MS.....	S10
<b>Table S1.</b> Structural assignment of precursor and product ions of protonated Y-CVX and Y-RVX .....	S11
<b>Table S2.</b> Structural assignment of precursor and product ions of protonated DEAET-CP originating from CVX and RVX.....	S12
<b>Table S3.</b> Structural assignment of precursor and product ions of protonated MPC-DEAET originating from CVX and RVX.....	S13
<b>Table S4.</b> Structural assignment of precursor and product ions of protonated DIC-DEAET originating from CVX and RVX.....	S14

## 1. Materials and methods

Thin-layer chromatography was carried out on Merck (Darmstadt, Germany) aluminum sheets, silica gel 60 F254 with detection by UV light at 254 nm and preparative column chromatography on Merck silica gel 60 (70–230 mesh). Melting points (mp) were determined on a Büchi (Essen, Germany) 510 oil bath apparatus. LC-MS analyses were carried out using an API2000 (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) mass spectrometer coupled to an Agilent (Santa Clara, CA, USA) 1100 LC system using a Phenomenex Luna C18 column (Phenomenex, Aschaffenburg, Germany; 50 × 2.0 mm, particle size 3 µm). Purity of the compounds was determined using the DAD of the LC-MS instrument. HR MS were recorded on a microTOF-Q (Bruker, Köln, Germany; ESI) mass spectrometer connected to a Dionex (Thermo Scientific, Braunschweig, Germany) Ultimate 3000 LC using a Nucleodur C18 Gravity column (Macherey-Nagel, Düren, Germany; 50 × 2.0 mm, 3 µm). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz) and <sup>13</sup>C NMR (126 MHz) spectra were recorded on a Bruker Avance DRX 500 and <sup>1</sup>H NMR (600 MHz) and <sup>13</sup>C NMR (151 MHz) spectra on a Bruker Avance III 600 NMR spectrometer. Chemical shifts δ are given in ppm referring to the signal center using the solvent peaks (dimethyl sulfoxide-*d*<sub>6</sub>, DMSO-*d*<sub>6</sub>) for reference, 2.49/39.7 ppm). L-cystine bis(*tert*-butyl ester) dihydrochloride and Boc-L-Met-L-Pro-OH were obtained from Bachem (Bubendorf, Switzerland), Boc-L-aspartic acid 4-*tert*-butyl ester from Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany) and L-isoleucine benzyl ester 4-toluenesulphonate from Fluorochem (Hadfield, United Kingdom).

### 1.1. Syntheses

#### a) *Bis*-Boc-MetProCys-O-*t*-Bu (3)

Boc-MetPro-OH (0.971 g, 2.8 mmol) was treated with cystine bis(*tert*-butyl ester) dihydrochloride (0.568 g, 1.3 mmol), 3-(bis(dimethylamino)methyl)imidazolium-3H-benzotriazol-1-oxide hexafluorophosphate (HBTU, 1.06 g, 2.8 mmol), hydroxybenzotriazole monohydrate (HOBt × H<sub>2</sub>O, 0.429 g, 2.8 mmol), diisopropylethylamine (DIPEA, 0.690 g, 5.3 mmol) in a mixture of dry dichloromethane (DCM, 35 mL) and dry tetrahydrofuran (THF, 35 mL) at room temperature for 4 h. The solvent was removed *in vacuo*, the resulting residue redissolved in ethyl acetate (40 mL) and washed with 10% citric acid (3 × 40 mL), 10% sodium bicarbonate (3 × 40 mL), and brine (1 × 40 mL). The organic layer was dried using sodium sulfate, filtered and evaporated to dryness. Purification was achieved by preparative chromatography (petroleum ether/ethyl acetate, 1:1 to 3:7) providing *bis*-Boc-MetProCys-O-*t*-

Bu as a colorless oil (**3**; 1.22 g, 93% yield);  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  1.35, 1.38 ( $2 \times s$ , 36H), 1.71-1.94 (m, 10H), 2.01-2.09 (m, 8H), 2.50-2.56 (m, 4H), 2.95 (dd,  $J = 13.6$ , 8.2 Hz, 2H), 3.11 (dd,  $J = 13.6$ , 5.5 Hz, 2H), 3.55-3.67 (m, 4H), 4.28-4.38 (m, 6H), 6.97 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 8.21 (d,  $J = 7.7$  Hz, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  14.83, 24.46, 27.68, 28.31, 29.16, 29.67, 30.96, 46.79, 51.13, 52.40, 59.19, 78.12, 81.31, 155.51, 169.43, 170.41, 171.67, the  $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-S-S}$  carbon signal is obscured by the solvent signal; LC-MS ( $\text{ESI}^+$ ) (90%  $\text{H}_2\text{O}$  to 100% methanol (MeOH) in 10 min, then 100% MeOH over 10 min, DAD 200-400 nm), 92% purity,  $m/z$  1009.6 ( $[\text{M} + \text{H}]^+$ ), 1026.6 ( $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ ).

b) Boc-MetProCys-O-*t*-Bu (**1**)

In a Schlenk tube, *bis*-Boc-MetProCys-O-*t*-Bu (**3**; 1.090 g, 1.1 mmol) was treated with Cleland's reagent (1,4-dithiothreitol, DTT, 0.692 g, 4.4 mmol) and triethylamine (0.445 g, 4.4 mmol) in degassed DCM (50 mL) under an argon atmosphere for 24 h at room temperature. Subsequently, the solvent was removed *in vacuo*, the residue redissolved in argon-saturated ethyl acetate (50 mL) and washed with degassed 10% citric acid ( $3 \times 25$  mL) and degassed water ( $3 \times 25$  mL). The organic layer was dried using sodium sulfate, filtered and evaporated to dryness. Purification was achieved by preparative chromatography (degassed petroleum ether/degassed ethyl acetate, 4:1 to 1:1) providing Boc-MetProCys-O-*t*-Bu as a clear oil (**1**; 0.813 g, 73% yield);  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  1.35, 1.39 ( $2 \times s$ , 18H), 1.71-1.77 (m, 1H), 1.78-1.97 (m, 4H), 2.03-2.08 (m, 4H), 2.43 (t,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 2.73-2.78 (m, 1H), 2.79-2.83 (m, 1H), 3.55-3.60 (m, 1H), 3.63-3.68 (m, 1H), 4.26-4.30 (m, 2H), 4.39 (dd,  $J = 8.5$ , 4.2 Hz, 1H), 7.02 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 8.17 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), the signals of the two  $\text{H}_3\text{C-S-CH}_2$  protons are obscured by the solvent signal;  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  15.16, 24.97, 25.93, 28.08, 28.67, 29.44, 29.96, 31.22, 47.23, 51.49, 55.36, 59.60, 78.48, 81.57, 155.89, 169.57, 170.85, 172.06; LC-MS ( $\text{ESI}^+$ ) (90%  $\text{H}_2\text{O}$  to 100% MeOH in 10 min, then 100% MeOH over 10 min, DAD 200-400 nm), 96% purity,  $m/z$  506.6 ( $[\text{M} + \text{H}]^+$ ); HR MS ( $\text{ESI}^+$ ):  $m/z$  ( $[\text{M} + \text{H}]^+$ ) calcd. for  $\text{C}_{22}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}_2$ : 506.2353; found: 506.2320.

c) Boc-Asp(*t*-Bu)Ile-O-Bzl (**4**)

Boc-aspartic acid 4-*tert*-butyl ester (1.45 g, 5.0 mmol) was dissolved in dry dimethylformamide (DMF, 15 mL) in the presence of HBTU (1.90 g, 5.0 mmol) and activated at room temperature for 30 min. Isoleucine benzyl ester 4-toluenesulphonate (1.97 g,

5.0 mmol) and DIPEA (1.94 g, 15 mmol) were added and the mixture was stirred at room temperature for 24 h. The solvent was evaporated, the resulting residue redissolved in ethyl acetate (40 mL) and washed with saturated aqueous sodium bicarbonate (1 × 40 mL), 10% aqueous potassium bisulfate (1 × 40 mL), water (1 × 40 mL), saturated aqueous sodium bicarbonate (1 × 40 mL), 10% aqueous potassium bisulfate (1 × 40 mL) and brine (1 × 40 mL). The organic layer was dried using sodium sulfate, filtered and evaporated to dryness. The residue was purified by column chromatography (petroleum ether/ethyl acetate 4:1) yielding Boc-Asp(*t*-Bu)Ile-O-Bzl as a colorless oil (**4**; 2.02 g, 82% yield); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.77-0.82 (m, 6H), 1.09-1.18 (m, 1H), 1.30-1.39 (m, 1H), 1.37 (s, 18H), 1.75-1.85 (m, 1H), 2.38 (dd, *J* = 16.0, 9.1 Hz, 1H), 2.56 (dd, *J* = 16.1, 5.4 Hz, 1H), 4.26 (dd, *J* = 8.2, 6.1 Hz, 1H), 4.33 (td, *J* = 8.8, 5.3 Hz, 1H), 5.08 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H), 5.13 (d, *J* = 12.5 Hz, 1H), 7.10 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.30-7.39 (m, 5H), 7.85 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 11.20, 15.44, 24.68, 27.81, 28.27, 36.59, 37.36, 50.92, 56.50, 66.09, 78.47, 80.12, 128.16, 128.22, 128.51, 135.89, 155.34, 169.35, 169.35, 171.19; LC-MS (ESI<sup>+</sup>) (90% H<sub>2</sub>O to 100% MeOH in 10 min, then 100% MeOH over 10 min, DAD 200-400 nm), 99% purity, *m/z* 493.1 ([M + H]<sup>+</sup>), 510.2 ([M + NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>).

d) Boc-Asp(*t*-Bu)Ile-OH (**5**)

Boc-Asp(*t*-Bu)Ile-O-Bzl (**4**; 1.97 g, 4.0 mmol) was dissolved in dry MeOH (50 mL) containing palladium on activated charcoal (Pd/C, 10% Pd) and was hydrogenated under atmospheric pressure at room temperature for 24 h. The catalyst was filtered off and washed twice with MeOH. Removal of the organic solvent *in vacuo* resulted in a clear oil (**5**; 1.59 g, 99% yield) which was used without further purification for the next step; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.80-0.85 (m, 6H), 1.11-1.18 (m, 1H), 1.33-1.42 (m, 1H), 1.37 (s, 18H), 1.71-1.82 (m, 1H), 2.39 (dd, *J* = 16.0, 8.8 Hz, 1H), 2.56-2.65 (m, 1H), 4.16 (dd, *J* = 8.5, 5.4 Hz, 1H), 4.29 (td, *J* = 8.5, 5.5 Hz, 1H), 7.17 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.54 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 11.43, 15.54, 24.63, 27.81, 28.27, 36.82, 37.26, 51.08, 56.33, 78.55, 80.12, 155.38, 169.45, 170.78, 172.75; LC-MS (ESI<sup>+</sup>) (90% H<sub>2</sub>O to 100% MeOH in 10 min, then 100% MeOH over 10 min, DAD 200-400 nm), 100% purity, *m/z* 403.4 ([M + H]<sup>+</sup>), 420.4 ([M + NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>).

e) Bis-Boc-Asp(*t*-Bu)IleCys-O-*t*-Bu (6)

Boc-Asp(*t*-Bu)Ile-OH (**5**; 1.57 g, 3.9 mmol) was treated with cystine bis(*tert*-butyl ester) dihydrochloride (0.808 g, 1.9 mmol), HBTU (1.48 g, 3.9 mmol), HOBT × H<sub>2</sub>O (0.597 g, 3.9 mmol), DIPEA (0.957 g, 7.4 mmol) in a mixture of dry DCM (50 mL) and dry THF (50 mL) at room temperature for 4 h. The solvent was removed *in vacuo*, the resulting residue redissolved in ethyl acetate (60 mL) and washed with 10% citric acid (3 × 60 mL), 10% aqueous sodium bicarbonate (3 × 60 mL), and brine (1 × 60 mL). The organic layer was dried using sodium sulfate, filtered and evaporated to dryness. Purification was achieved by preparative chromatography (petroleum ether/ethyl acetate, 4:1 to 7:3) providing *bis*-Boc-Asp(*t*-Bu)IleCys-O-*t*-Bu as a white solid (**6**; 1.246 g, 58% yield); mp 133-136 °C; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.74-0.87 (m, 12H), 0.98-1.10 (m, 2H), 1.22-1.47 (m, 56H), 1.65-1.72 (m, 2H), 2.39 (dd, *J* = 15.9, 8.7 Hz, 2H), 2.61 (dd, *J* = 15.9, 5.8 Hz, 2H), 2.92 (dd, *J* = 13.6, 8.1 Hz, 2H), 3.10 (dd, *J* = 13.6, 5.7 Hz, 2H), 4.23-4.28 (m, 4H), 4.42 (td, *J* = 7.8, 5.7 Hz, 2H), 7.23 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.40 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 8.45 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 11.23, 15.25, 24.00, 27.66, 27.81, 28.26, 37.18, 37.61, 51.22, 52.34, 56.42, 78.59, 80.08, 81.38, 155.37, 169.25, 169.48, 170.46, 170.70, the CH<sub>2</sub>-S-S carbon signal is obscured by the solvent signal; LC-MS (ESI<sup>+</sup>) (60% H<sub>2</sub>O to 100% MeOH in 10 min, then 100% MeOH over 10 min, DAD 200-400 nm), 100% purity, *m/z* 1121.3 ([M + H]<sup>+</sup>), 1138.3 ([M + NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>).

f) Boc-Asp(*t*-Bu)IleCys-O-*t*-Bu (2)

*Bis*-Boc-Asp(*t*-Bu)IleCys-O-*t*-Bu (**6**; 1.23 g, 1.1 mmol) was reduced with DTT (0.680 g, 4.4 mmol) and triethylamine (0.445 g, 4.4 mmol) in degassed DCM (50 mL) under an argon atmosphere for 24 h at room temperature. The solvent was removed *in vacuo*, the residue redissolved in argon-saturated ethyl acetate (50 mL) and washed with degassed 10% citric acid (3 × 50 mL) and degassed water (3 × 50 mL). The organic layer was dried using sodium sulfate, filtered and evaporated to dryness. The product was purified by preparative chromatography (gradient degassed petroleum ether/degassed ethyl acetate from 4:1 to 7:3) providing Boc-Asp(*t*-Bu)IleCys-O-*t*-Bu as a colorless solid (**2**; 1.084 g, 88% yield); mp 92-94 °C; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.76-0.88 (m, 6H), 0.99-1.12 (m, 1H), 1.28-1.48 (3 × s, m, 28H), 1.67-1.73 (m, 1H), 2.35-2.44 (m, 2H), 2.62 (dd, *J* = 15.9, 5.9 Hz, 1H), 2.68-2.74 (m, 1H), 2.77-2.82 (m, 1H), 4.23-4.32 (m, 3H), 7.23 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.45 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 8.31 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 11.19, 15.26,

24.09, 25.44, 27.72, 27.81, 28.26, 37.20, 37.38, 51.20, 55.20, 56.53, 78.57, 80.10, 81.23, 155.36, 169.09, 169.50, 170.56, 170.78; LC-MS (ESI<sup>+</sup>) (90% H<sub>2</sub>O to 100% MeOH in 10 min, then 100% MeOH over 10 min, DAD 200-400 nm), 96% purity, *m/z* 562.3 ([M + H]<sup>+</sup>), 579.5 ([M + NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>); HR MS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* ([M + H]<sup>+</sup>) calcd. for C<sub>26</sub>H<sub>47</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>S: 562.3157; found: 506.3137.

g) Preparation of MPC and DIC disulfide-adducts as reference compounds

Solutions of Boc-MetProCys-O-*t*-Bu (**1**) and Boc-Asp(*t*-Bu)IleCys-O-*t*-Bu (**2**) in DCM (final concentration 588.0 μM) were mixed with solutions of VX and CVX in ACN resulting in a 1:2 molar ratio of tripeptide:OPNA. The reaction was carried out for 1 h at 40 °C while gently shaking followed by addition of 250 μL of pure TFA for deprotection of the N- and C-termini. After 30 min at 40 °C, the reaction mixtures were evaporated to dryness under a stream of nitrogen. For complete removal of remaining TFA, this procedure was repeated with another 250 μL DCM and residues were redissolved in 500 μL of a mixture of 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> buffer and ACN (50:50 v/v).

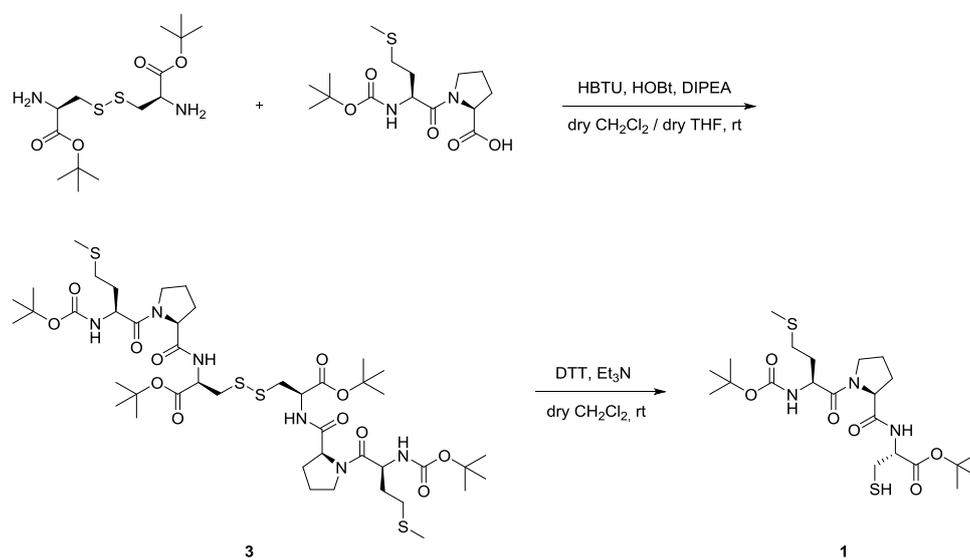
1.2. Co-injection of MPC and DIC disulfide-adducts as reference compounds

For confirmation of MPC and DIC disulfide-adduct identity, co-injection experiments were performed. HSA, incubated at a molar ratio of HSA:OPNA 1:20, was processed as described in the main text (see ‘Incubation of HSA and sample preparation’) and the filtrate was diluted 1:3 with NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> buffer to yield a final volume of 120 μL. Finally, respective solutions of synthetic MPC (8 μL) and DIC disulfide-adducts (2 μL) (see above) were added prior to μLC-ESI MS/HR MS analysis.

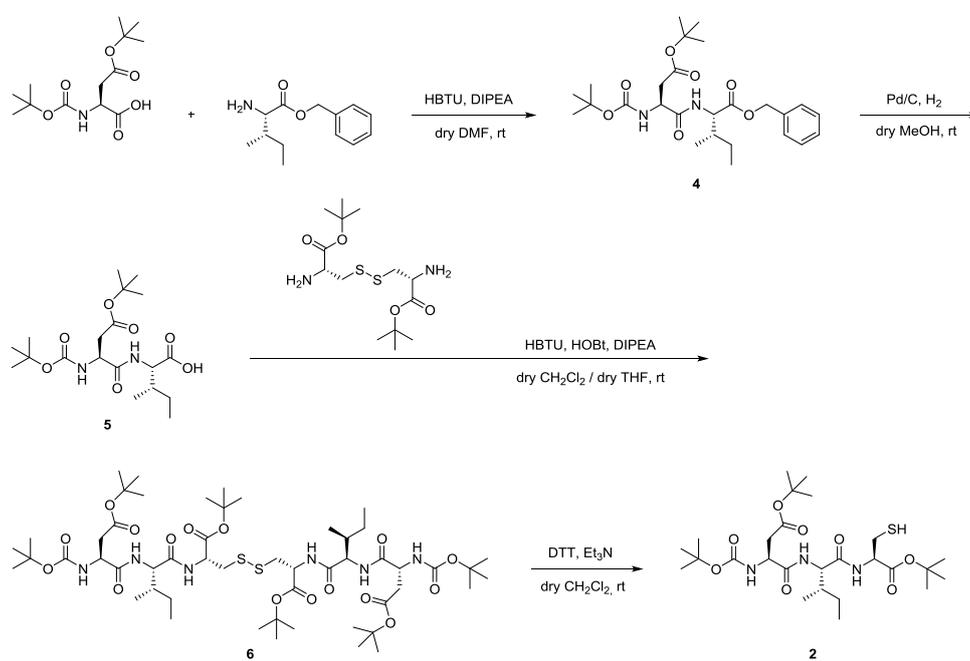
## 2. Results and discussion

In addition to identification of MPC and DIC disulfide-adducts by MS/HR MS, identity of these adducts was also confirmed chromatographically by co-injection of synthetic reference materials. These were obtained by reacting the Boc- and *t*-Bu-protected tripeptides Boc-MetProCys-O-*t*-Bu (**1**) and Boc-Asp(*t*-Bu)IleCys-O-*t*-Bu (**2**) with either VX or CVX followed by deprotection using TFA. As leaving groups of CVX and RVX are identical (see main text, Figure 1) only CVX was used for chromatographic confirmation of tripeptide disulfide-adducts. Subsequently, references were added to freshly processed samples of adducted HSA for  $\mu$ LC-ESI MS/HR MS analysis.

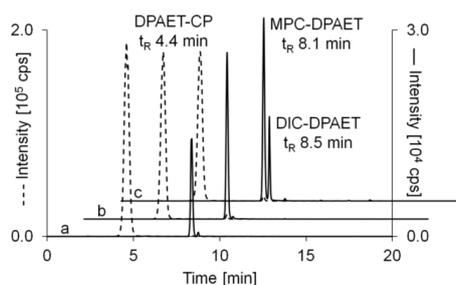
HSA-VX disulfide-adducts produced from the intact protein eluted as three distinct peaks (Figure S3, trace a): DPAET-CP ( $t_R$  4.4 min), MPC-DPAET ( $t_R$  8.1 min) and in minority DIC-DPAET ( $t_R$  8.5 min). Despite their different amino acid composition, MPC-DPAET and DIC-DPAET exhibited very similar retention times, which is in accordance with their calculated octanol-water partition coefficients (MPC-DPAET:  $\log P \sim 2.63$ , DIC-DPAET:  $\log P \sim 2.69$ ; calculated using ChemDraw 16, PerkinElmer Informatics, Cambridge, Massachusetts, USA) indicating a quite similar polarity of both adducts. After addition of synthetic MPC-DPAET, the corresponding peak at  $t_R$  8.1 min increased significantly without showing any additional signals (Figure S3, trace b). Likewise, spiking with synthetic DIC-DPAET led to an exclusive increase of the peak at  $t_R$  8.5 min (Figure S3, trace c). Analogous results were obtained for MPC-DEAET and DIC-DEAET derived from CVX (data not shown).



**Figure S1.** Synthesis of Boc-MetProCys-O-*t*-Bu (**1**).



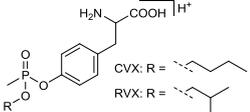
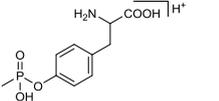
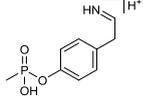
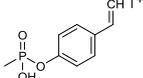
**Figure S2.** Synthesis of Boc-Asp(*t*-Bu)IleCys-O-*t*-Bu (**2**).



**Figure S3.** Confirmation of HSA-derived tripeptide disulfide-adducts of VX by  $\mu$ LC-ESI MS/HR MS.

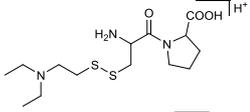
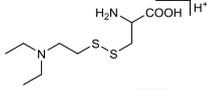
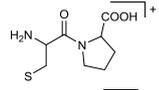
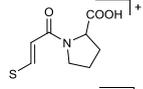
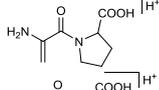
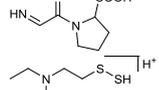
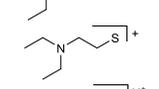
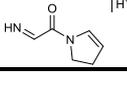
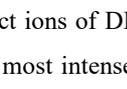
Proteolysis of HSA incubated with VX (molar ratio HSA:VX 1:20) with pronase yielded (trace a): DPAET-CP ( $t_R$  4.4 min, dashed line in Figure S3a–c, left y-axis), MPC-DPAET ( $t_R$  8.1 min, solid line in Figure S3a–c, right y-axis) and DIC-DPAET ( $t_R$  8.5 min, solid line in Figure S3a–c, right y-axis). After addition of synthetic MPC-DPAET to the sample mentioned above (trace b), only the peak at  $t_R$  8.1 min increased, thus confirming tripeptide identity. Upon addition of synthetic DIC-DPAET to the same sample (trace c) only the peak at  $t_R$  8.5 min increased, thus confirming identity of the second tripeptide disulfide-adduct. For reasons of clarity only the extracted ion chromatogram (XIC) corresponding to the most intense transition of each analyte is depicted:  $m/z$  378.2 to  $m/z$  160.1165  $\pm$  0.005 (DPAET-CP),  $m/z$  509.2 to  $m/z$  160.1165  $\pm$  0.005 (MPC-DPAET, DIC-DPAET). Chromatographic separation was performed on an Atlantis T3 C18 column (50  $\times$  1.0 mm I.D., 3  $\mu$ m, 100  $\text{\AA}$ ) at 65  $^\circ\text{C}$  and a flow of 30  $\mu\text{L}/\text{min}$  with solvent A (0.05% v/v FA) and solvent B (ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  80:20 v/v, 0.05% v/v FA) in gradient mode. DPAET-CP, 2-(diisopropylamino)ethanethiol-CysPro; DIC-DPAET, AspIleCys-2-(diisopropylamino)ethanethiol; MPC-DPAET, MetProCys-2-(diisopropylamino)ethanethiol. For chemical structures see the main text (Figure 1).

**Table S1.** Structural assignment of precursor and product ions of protonated Y-CVX and Y-RVX.

ion	elemental composition	$m/z$ theoretical	$m/z$ measured	$\Delta m/z$	$\Delta m/z$ (ppm)
	C <sub>14</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>5</sub> P	316.1308	316.1304 (316.1318)	-0.0004 (0.0010)	-1.3 (3.2)
	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>5</sub> P	260.0682 <sup>b</sup>	260.0674 (260.0679)	-0.0008 (-0.0003)	-3.1 (-1.2)
	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>3</sub> P	214.0628 <sup>a</sup>	214.0621 (214.0626)	-0.0007 (-0.0002)	-3.3 (-0.9)
	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub> P	197.0362	197.0355 (197.0362)	-0.0007 (0)	-3.6 (0)

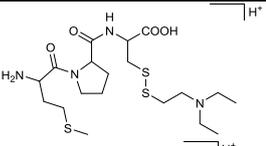
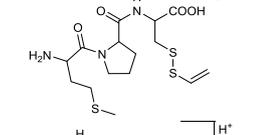
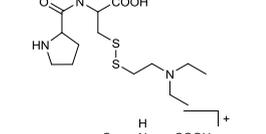
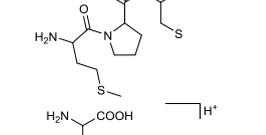
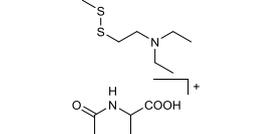
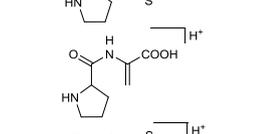
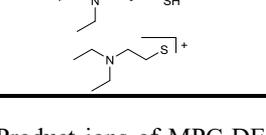
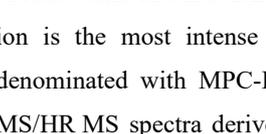
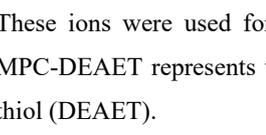
Product ions of Y-RVX are given in parentheses. <sup>a</sup> This product ion is the most intense ion in MS/HR MS spectra derived from Y-CVX as well as Y-RVX and is denominated with Y-CVX\_a and Y-RVX\_a, respectively. <sup>b</sup> This product ion is the second most intense ion in MS/HR MS spectra derived from Y-CVX as well as Y-RVX and is denominated with Y-CVX\_b and Y-RVX\_b, respectively. These ions were used for sensitive detection of adducts according to the OPCW criteria. Y-CVX and Y-RVX represent the phosphonylated tyrosine-adducts of CVX and RVX, respectively.

**Table S2.** Structural assignment of precursor and product ions of protonated DEAET-CP originating from CVX and RVX.

ion	elemental composition	$m/z$ theoretical	$m/z$ measured	$\Delta m/z$	$\Delta m/z$ (ppm)
	$C_{14}H_{28}N_3O_3S_2$	350.1567	350.1575 (350.1581)	0.0008 (0.0014)	2.3 (4.0)
	$C_9H_{21}N_2O_2S_2$	253.1039	253.1041 (253.1047)	0.0002 (0.0008)	0.8 (3.2)
	$C_8H_{13}N_2O_3S$	217.0647 <sup>b</sup>	217.0639 (217.0643)	-0.0008 (-0.0004)	-3.7 (-1.8)
	$C_8H_{10}NO_3S$	200.0381	200.0377 (200.0382)	-0.0004 (0.0001)	-2.0 (0.5)
	$C_8H_{13}N_2O_3$	185.0921	185.0922 (185.0925)	0.0001 (0.0004)	0.5 (2.2)
	$C_7H_{11}N_2O_3$	171.0770	171.0764 (171.0769)	-0.0006 (-0.0001)	-3.5 (-0.6)
	$C_6H_{16}NS_2$	166.0719	166.0717 (166.0722)	-0.0002 (0.0003)	-1.2 (1.8)
	$C_6H_{14}NS$	132.0847 <sup>a</sup>	132.0836 (132.0842)	-0.0011 (-0.0005)	-8.3 (-3.8)
	$C_6H_9N_2O$	125.0709	125.0710 (125.0714)	0.0001 (0.0005)	0.8 (4.0)

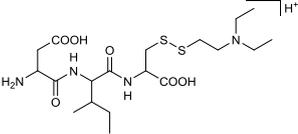
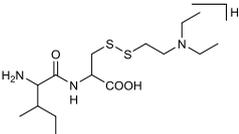
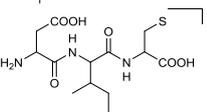
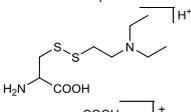
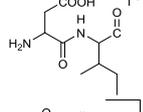
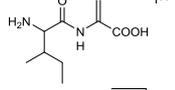
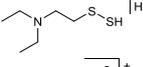
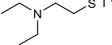
Product ions of DEAET-CP obtained from RVX are given in parentheses. <sup>a</sup> This product ion is the most intense ion in MS/HR MS spectra derived from DEAET-CP and is denominated with DEAET-CP\_a. <sup>b</sup> This product ion is the second most intense ion in MS/HR MS spectra derived from DEAET-CP and is denominated with DEAET-CP\_b. These ions were used for sensitive detection of adducts according to the OPCW criteria. DEAET-CP represents the disulfide-adduct of Cys<sup>34</sup>Pro with 2-(diethylamino)ethanethiol (DEAET).

**Table S3.** Structural assignment of precursor and product ions of protonated MPC-DEAET originating from CVX and RVX.

ion	elemental composition	$m/z$ theoretical	$m/z$ measured	$\Delta m/z$	$\Delta m/z$ (ppm)
	$C_{19}H_{37}N_4O_4S_3$	481.1971	481.1990 (481.1989)	0.0019 (0.0018)	3.9 (3.7)
	$C_{15}H_{26}N_3O_4S_3$	408.1080	408.1090 (408.1094)	0.0010 (0.0014)	2.5 (3.4)
	$C_{14}H_{28}N_3O_3S_2$	350.1567	350.1574 (350.1580)	0.0007 (0.0013)	2.0 (3.7)
	$C_{13}H_{22}N_3O_4S_2$	348.1046	348.1060 (348.1064)	0.0014 (0.0018)	4.0 (5.2)
	$C_9H_{21}N_2O_2S_2$	253.1039 <sup>b</sup>	253.1043 (253.1046)	0.0004 (0.0007)	1.6 (2.8)
	$C_8H_{13}N_2O_3S$	217.0647	217.0641 (217.0646)	-0.0006 (-0.0001)	-2.8 (-0.5)
	$C_8H_{13}N_2O_3$	185.0921	185.0922 (185.0925)	0.0001 (0.0004)	0.5 (2.2)
	$C_6H_{16}NS_2$	166.0719	166.0717 (166.0723)	-0.0002 (0.0004)	-1.2 (2.4)
	$C_6H_{14}NS$	132.0847 <sup>a</sup>	132.0836 (132.0842)	-0.0011 (-0.0005)	-8.3 (-3.8)

Product ions of MPC-DEAET obtained from RVX are given in parentheses. <sup>a</sup> This product ion is the most intense ion in MS/HR MS spectra derived from MPC-DEAET and is denominated with MPC-DEAET\_a. <sup>b</sup> This product ion is the second most intense ion in MS/HR MS spectra derived from MPC-DEAET and is denominated with MPC-DEAET\_b. These ions were used for sensitive detection of adducts according to the OPCW criteria. MPC-DEAET represents the disulfide-adduct of MetProCys<sup>448</sup> with 2-(diethylamino)ethane-thiol (DEAET).

**Table S4.** Structural assignment of precursor and product ions of protonated DIC-DEAET originating from CVX and RVX.

ion	elemental composition	$m/z$ theoretical	$m/z$ measured	$\Delta m/z$	$\Delta m/z$ (ppm)
	C <sub>19</sub> H <sub>37</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub>	481.2149	481.2116 (481.2141)	-0.0033 (-0.0008)	-6.9 (-1.7)
	C <sub>15</sub> H <sub>32</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	366.1880	366.1894 (366.1887)	0.0014 (0.0007)	3.8 (1.9)
	C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S	348.1229	348.1201 (348.1224)	-0.0028 (-0.0005)	-8.0 (-1.4)
	C <sub>9</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	253.1039	253.1042 (253.1039)	0.0003 (0)	1.2 (0)
	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	229.1183	229.1183 (229.1184)	0 (0.0001)	0 (0.4)
	C <sub>9</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	201.1234	201.1232 (201.1240)	-0.0002 (0.0006)	-1.0 (3.0)
	C <sub>6</sub> H <sub>16</sub> NS <sub>2</sub>	166.0719	166.0717 (166.0720)	-0.0002 (0.0001)	-1.2 (0.6)
	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> NS	132.0847	132.0840 (132.0846)	-0.0007 (-0.0001)	-5.3 (-0.8)

Product ions of DIC-DEAET obtained from RVX are given in parentheses. DIC-DEAET represents the disulfide-adduct of AspIleCys<sup>514</sup> with 2-(diethylamino)ethanethiol (DEAET).

## 3.4 Vierte Veröffentlichung

### 3.4.1 Artikel

#### Novel cysteine- and albumin-adduct biomarkers to prove human poisoning with the pesticide oxydemeton-*S*-methyl

H. John, M. Siegert, F. Eyer, F. Worek, H. Thiermann, A. Kranawetvogl. *Toxicology Letters*, 294:122–134, 2018.

DOI: 10.1016/j.toxlet.2018.05.023

Die Eignung eines Analyten als Biomarker für die Verifikation einer Vergiftung mit phosphororganischen Cholinesteraseinhibitoren lässt sich mit Sicherheit nur dann beurteilen, wenn die Untersuchung von klinischen Proben aus einem realen Vergiftungsfall den Nachweis und die Identifizierung der aufgenommenen Verbindung ermöglicht. Da im Falle der in den vorangegangenen Veröffentlichungen beschriebenen Disulfid-Addukte zwischen HSA und den Nervenkampfstoffen VX, CVX und RVX keine Realproben zur Verfügung standen, sollte untersucht werden, ob das Prinzip der Bildung von Disulfid-Addukten auf die strukturell sehr ähnlich aufgebauten phosphororganischen Pestizide übertragen werden kann. Hierzu wurden die beiden Verbindungen Oxydemeton-*S*-methyl (ODM) und deren Hauptmetabolit Demeton-*S*-methyl sulfon (DSMS) ausgewählt, da diese einerseits über thiolhaltige Abgangsgruppen verfügen (ODM: 2-(Ethylsulfanyl)ethanthiol, ESOET; DSMS: 2-(Ethylsulfonyl)ethanthiol, ESO<sub>2</sub>ET) und andererseits auf klinische Proben einer Vergiftung mit der Pestizidzubereitung Metasystox<sup>®</sup> (ODM) zurückgegriffen werden konnte.

Analog zu den vorangegangenen Publikationen konnten sowohl das CysPro-Dipeptid-Disulfid-Addukt mit der Abgangsgruppe von ODM (ESOET-CysPro) als auch mit der Abgangsgruppe von DSMS (ESO<sub>2</sub>ET-CysPro) in gereinigtem HSA und Serum detektiert werden. Zusätzlich erlaubte die gezielte Suche nach Disulfid-Addukten bestehend aus einem einzelnen Cystein die Identifizierung von ESOET-Cys sowie ESO<sub>2</sub>ET-Cys als weitere potentielle Biomarker. Das sowohl zu ODM als auch zu DSMS korrespondierende Tyrosin-Addukt (*O,O*-Dimethylphosphotyrosin, Tyr-DMP) wurde ebenfalls in die Methode integriert.

Um die Herkunft der einzelnen Addukte genauer untersuchen zu können, wurde ODM-inkubiertes Serum getrennt nach der Proteinfraction, der proteinfreien Fraction sowie dem

enthaltenen HSA auf die Anwesenheit von Disulfid- und Tyrosin-Addukten untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass CysPro-Disulfid-Addukte ausschließlich, Cys-Disulfid-Addukte jedoch nur zu einem geringen Anteil aus HSA stammen. Letztere gehen vermutlich überwiegend aus im Serum frei vorliegenden Aminosäuren (Cystein und Cystin) sowie anderen Serumproteinen hervor. Tyrosin-Addukte wiederum stammen nur zu einem kleinen Teil aus frei vorliegendem Tyrosin. Die Proteinfraction (vor allem HSA) konnte als Quelle der detektierten Tyrosin-Addukte identifiziert werden. Schließlich ergab die Inkubation einer Pronaselösung mit ODM in Abwesenheit von Serum, dass zwar keine CysPro-Disulfid-Addukte, jedoch geringe Mengen an Tyrosin- und erhebliche Mengen an Cys-Disulfid-Addukten vermutlich durch autoproteolytische Zersetzung aus Pronase freigesetzt werden können. Der Anteil an der detektierbaren Adduktmenge nach Pronasespaltung von Serum liegt jedoch abhängig von der Pestizidkonzentration höchstwahrscheinlich deutlich niedriger, da die Serumkomponenten mit Pronase um das freie Pestizid konkurrieren.

Im Hinblick auf die Untersuchung von klinischen Plasmaproben wurde die Probenvorbereitung an das von John et al. entwickelte Verfahren der pronasevermittelten Direktspaltung zur Proteolyse von Plasma angepasst [56]. Dabei wird Plasma mit einer stark konzentrierten Pronaselösung versetzt und direkt proteolysiert. Die hohe Pronasekonzentration ist erforderlich, um die Hemmung des Enzyms durch das häufig eingesetzte Antikoagulans EDTA zu kompensieren. Dadurch kann sichergestellt werden, dass unabhängig von der Art des verwendeten Antikoagulans unter den gewählten Reaktionsbedingungen (Proteolyse für 2 Stunden bei 37 °C) die maximale Analytausbeute erhalten wird und damit möglichst empfindlich gemessen werden kann.

Bei der Untersuchung von klinischen Plasmaproben einer Vergiftung mit der Zubereitung Metasystox<sup>®</sup> (ODM) konnte die Identität des aufgenommenen Pestizids anhand der Detektion von Disulfid- (ESOET-CysPro, ESO<sub>2</sub>ET-CysPro, ESOET-Cys) und Tyrosin-Addukten (Tyr-DMP) eindeutig bestätigt werden. Im Vergleich zu Tyr-DMP war die detektierte Intensität der Disulfid-Addukte deutlich höher (ESOET-CysPro: 200-fach), was durch eine stärkere Bildung *in vivo* sowie durch die bessere Ionisierbarkeit dieser Verbindungen im Massenspektrometer erklärt wurde. Zudem war der Nachweis der ODM-Vergiftung anhand von Tyr-DMP nur bis zu 2 Stunden nach Krankenhauseinweisung möglich, wohingegen die Disulfid-Addukte für mindestens 8 Stunden (ESOET-CysPro: 73 Stunden) noch zuverlässig detektierbar waren. Allerdings entsprachen diese Zeitfenster nicht den aufgrund der 20-tägigen Halbwertszeit von HSA an die Addukte gestellten Erwartungen. Mögliche Ursachen wie ein beschleunigter Abbau von modifiziertem HSA aufgrund der Denaturierung durch Öffnung von Disulfidbrücken wurden diskutiert, konnten jedoch abschließend nicht geklärt werden. Dennoch ließ sich die Eignung der in dieser Dissertation beschriebenen Disulfid-Addukte als selektive und hochsensitive Biomarker eindeutig belegen. Sie stellen damit eine wertvolle Ergänzung bestehender Biomarker zum Nachweis einer Vergiftung mit phosphororganischen Cholinesteraseinhibitoren dar.

Hinweis

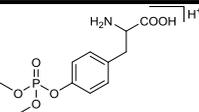
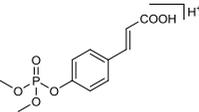
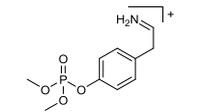
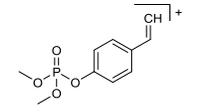
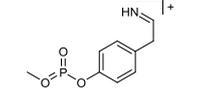
An dieser Stelle wird auf die Wiedergabe der vorgenannten Publikation verzichtet, da diese bereits in einer wissenschaftlichen Fachzeitschrift veröffentlicht worden ist.

Stattdessen wird im Einklang mit § 8 Absatz 5 Satz 2 der Promotionsordnung für die Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München vom 1. Juni 1983 in der Fassung der elften Änderungssatzung vom 15. September 2016 auf die zugehörige Fundstelle verwiesen:

<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.05.023>

## 3.4.2 Supplement

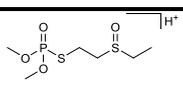
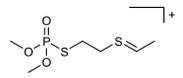
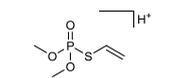
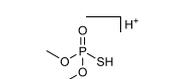
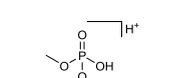
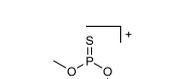
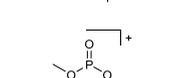
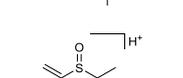
Table S1: Precursor and product ions of protonated Tyr-DMP

ion	elemental composition	<i>m/z</i> theoretical	<i>m/z</i> measured	$\Delta m/z$ [Th]	$\Delta m/z$ [ppm]
	C <sub>11</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>6</sub> P	290.0788	290.0814	0.0026	9.0
	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub> P	273.0523	273.0527	0.0004	1.5
	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>4</sub> P	244.0733	244.0730	-0.0003	-1.2
	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub> P	227.0468	227.0462	-0.0006	-2.6
	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> P	212.0471	212.0468	-0.0003	-1.4

Data were extracted from  $\mu$ LC-ESI MS/HR MS analysis of proteolyzed human serum incubated with oxydemeton-S-methyl (ODM, 600  $\mu$ M). Fragment spectrum is shown in Figure 2E.

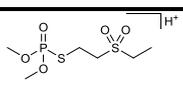
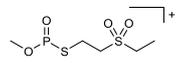
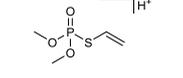
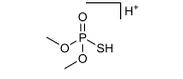
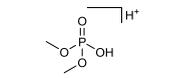
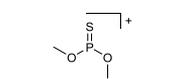
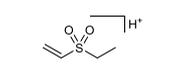
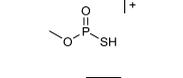
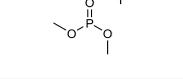
DMP: dimethylphosphoryl

Table S2: Precursor and product ions of protonated ODM

ion	elemental composition	$m/z$ theoretical	$m/z$ measured	$\Delta m/z$ [Th]	$\Delta m/z$ [ppm]
	C <sub>6</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub> PS <sub>2</sub>	247.0222	247.0207	-0.0015	-6.1
	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub> PS <sub>2</sub>	229.0117	229.0105	-0.0012	-5.2
	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub> PS	169.0083	169.0068	-0.0015	-8.9
	C <sub>2</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> PS	142.9926	142.9922	-0.0004	-2.8
	C <sub>2</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> P	127.0155	127.0148	-0.0007	-5.5
	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> PS	124.9821	124.9812	-0.0009	-7.2
	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> P	109.0049	109.0046	-0.0003	-2.8
	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> OS	105.0369	105.0366	-0.0003	-2.9

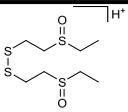
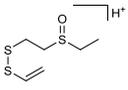
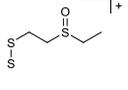
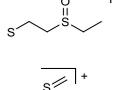
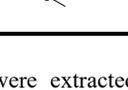
Data were extracted from  $\mu$ LC-ESI MS/HR MS analysis of proteolyzed human serum incubated with oxydemeton-S-methyl (ODM, 600  $\mu$ M). Fragment spectrum is shown in Figure 2A.

Table S3: Precursor and product ions of protonated DSMS

ion	elemental composition	$m/z$ theoretical	$m/z$ measured	$\Delta m/z$ [Th]	$\Delta m/z$ [ppm]
	C <sub>6</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub> PS <sub>2</sub>	263.0171	263.0178	0.0007	2.7
	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub> PS <sub>2</sub>	230.9909	230.9915	0.0006	2.6
	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub> PS	169.0083	169.0084	0.0001	0.6
	C <sub>2</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> PS	142.9926	142.9934	0.0008	5.6
	C <sub>2</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> P	127.0155	127.0161	0.0006	4.7
	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> PS	124.9821	124.9824	0.0003	2.4
	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub> S	121.0318	121.0322	0.0004	3.3
	CH <sub>4</sub> O <sub>2</sub> PS	110.9664	110.9674	0.0010	9.0
	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> P	109.0049	109.0053	0.0004	3.7

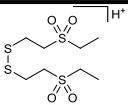
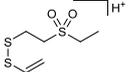
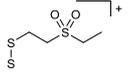
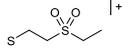
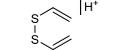
Data were extracted from  $\mu$ LC-ESI MS/HR MS analysis of proteolyzed human serum incubated with demeton-S-methyl sulfone (DSMS, 600  $\mu$ M). Fragment spectrum is shown in Figure 3A.

Table S4: Precursor and product ions of protonated ESOET-TESOE

ion	elemental composition	$m/z$ theoretical	$m/z$ measured	$\Delta m/z$ [Th]	$\Delta m/z$ [ppm]
	C <sub>8</sub> H <sub>19</sub> O <sub>2</sub> S <sub>4</sub>	275.0262	275.0261	-0.0001	-0.4
	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> OS <sub>3</sub>	197.0123	197.0114	-0.0009	-4.6
	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> OS <sub>3</sub>	168.9810	168.9795	-0.0015	-8.9
	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> OS <sub>2</sub>	137.0089	137.0090	0.0001	0.7
	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> S <sub>2</sub>	92.9827	92.9833	0.0006	6.5

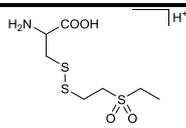
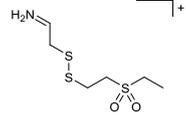
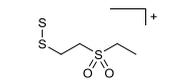
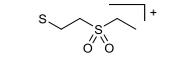
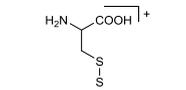
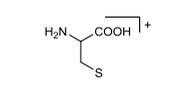
Data were extracted from  $\mu$ LC-ESI MS/HR MS analysis of proteolyzed human serum incubated with oxydemeton-S-methyl (ODM, 600  $\mu$ M). Fragment spectrum is shown in Figure 2D.

Table S5: Precursor and product ions of protonated ESO<sub>2</sub>ET-TESO<sub>2</sub>E

ion	elemental composition	<i>m/z</i> theoretical	<i>m/z</i> measured	$\Delta m/z$ [Th]	$\Delta m/z$ [ppm]
	C <sub>8</sub> H <sub>19</sub> O <sub>4</sub> S <sub>4</sub>	307.0161	307.0186	0.0025	8.1
	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> O <sub>2</sub> S <sub>3</sub>	213.0072	213.0084	0.0012	5.6
	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub> S <sub>3</sub>	184.9759	184.9769	0.0010	5.4
	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	153.0039	153.0047	0.0008	5.2
	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> S <sub>2</sub>	118.9984	118.9988	0.0004	3.4

Data were extracted from  $\mu$ LC-ESI MS/HR MS analysis of proteolyzed human serum incubated with demeton-S-methyl sulfone (DSMS, 600  $\mu$ M). Fragment spectrum is shown in Figure 2D.

Table S6: Precursor and product ions of protonated ESO<sub>2</sub>ET-Cys

ion	elemental composition	<i>m/z</i> theoretical	<i>m/z</i> measured	$\Delta m/z$ [Th]	$\Delta m/z$ [ppm]
	C <sub>7</sub> H <sub>16</sub> NO <sub>4</sub> S <sub>3</sub>	274.0236	274.0256	0.0020	7.3
	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>2</sub> S <sub>3</sub>	228.0181	228.0197	0.0016	7.0
	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub> S <sub>3</sub>	184.9759	184.9771	0.0012	6.5
	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	153.0039	153.0037	-0.0002	-1.3
	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	151.9835	151.9840	0.0005	3.3
	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>2</sub> S	120.0114	120.0119	0.0005	4.2

Data were extracted from  $\mu$ LC-ESI MS/HR MS analysis of proteolyzed human serum incubated with DSMS (600  $\mu$ M). Fragment spectrum is shown in Figure 3E.

ESO<sub>2</sub>ET: 2-(ethylsulfonyl)ethanethiol; DSMS: demeton-S-methyl sulfone

## 4 Zusammenfassung

Die Verifikation einer vermuteten Vergiftung mit phosphororganischen Verbindungen ist aus völkerrechtlichen, politischen sowie toxikologischen Gesichtspunkten von großem Interesse und stellt nach wie vor eine Herausforderung für die forensische Analytik dar. Um die betreffende Verbindung auch noch Tage bis Wochen nach einer Exposition nachweisen zu können, kommen zunehmend kovalente Addukte mit körpereigenen Proteinen als Langzeit-Biomarker zum Einsatz. Eine eindeutige Identifizierung ist dabei allerdings nur möglich, sofern sowohl der Phosphyl-Rest als auch die zugehörige Abgangsgruppe der phosphororganischen Verbindung analytisch erfasst werden. Während Addukte zwischen dem Phosphyl-Rest und nukleophilen Aminosäure-Resten in körpereigenen Proteinen bereits bekannt sind und standardmäßig in der Verifikationsanalytik eingesetzt werden, fehlen derartige Daten für die zugehörigen Abgangsgruppen.

Ziel der vorliegenden Dissertation war daher die Identifizierung von Disulfid-Addukten zwischen thiolhaltigen Abgangsgruppen und verschiedenen Plasmakomponenten als neue Klasse von potentiellen Langzeit-Biomarkern. Nach Inkubation von gereinigtem humanem Serumalbumin (HSA) und Plasma mit den V-Typ Nervenkampfstoffen VX, CVX und RVX konnten nach enzymatischer Spaltung mit Pronase CysPro Dipeptide detektiert werden, die mit den zugehörigen Abgangsgruppen über Disulfidbrücken verbunden waren. Der Einsatz von microbore Flüssigchromatographie gekoppelt mit hochauflösender Massenspektrometrie erlaubte dabei die hochselektive und hochsensitive Detektion dieser neuartigen Disulfid-Addukte sowie die simultane Erfassung von bereits etablierten Tyrosin-Addukten. Mithilfe eigens hierfür synthetisierter Peptidstandards konnten zudem MetProCys- und AspIleCys-Tripeptid-Disulfid-Addukte identifiziert werden. Hierdurch wurde gleichzeitig die Fähigkeit der thiolhaltigen Abgangsgruppen zur Öffnung von intramolekularen Disulfidbrücken in Proteinen deutlich. Die Bestimmung der Nachweisgrenzen der V-Stoffe in Plasma anhand international anerkannter Vorgaben der Organisation für das Verbot Chemischer Waffen demonstrierte zudem die Anwendbarkeit der entwickelten Methodik bei toxikologisch relevanten Plasmakonzentrationen.

Analog zu den Nervenkampfstoffen konnte die Übertragbarkeit der Bildung von Disulfid-Addukten anhand der beiden Verbindungen Oxydemeton-*S*-methyl und dessen Hauptmetaboliten Demeton-*S*-methyl sulfon auf phosphororganische Pestizide gezeigt werden. Abgesehen von HSA-Disulfid-Addukten konnten außerdem Disulfid-Addukte mit freiem Cystein/Cystin erstmalig nachgewiesen werden. Durch Untersuchung von Plasmaproben eines realen Vergiftungsfalls mit Oxydemeton-*S*-methyl konnte abschließend die Eignung der beschriebenen Disulfid-Addukte als Biomarker zum Nachweis einer Vergiftung mit phosphororganischen Verbindungen belegt werden.

## 5 Abstract

Verification of an alleged intoxication with organophosphorus compounds is of great legal, political and toxicological interest but still represents a challenging task for forensic analysis. In order to provide proof of poisoning days or even weeks post-exposure covalent adducts with endogenous proteins are increasingly used as long-term biomarkers. However, unambiguous identification is only feasible if both the phosphyl moiety as well as the leaving group of the respective organophosphorus compound is covered. Whereas adducts between the phosphyl moiety and nucleophilic amino acid residues in endogenous proteins have already been known and are used for verification by default, such data are missing for the corresponding leaving groups.

Therefore, the aim of the present thesis was to identify disulfide-adducts between thiol-containing leaving groups and different plasma components as a new class of potential long-term biomarkers. Upon incubation of neat human serum albumin (HSA) and plasma with the V-type nerve agents VX, CVX and RVX followed by enzymatic proteolysis using pronase CysPro dipeptides could be detected that were linked to the corresponding leaving groups via disulfide bridges. Microbore liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry allowed highly selective and sensitive detection of these novel disulfide-adducts together with already established tyrosine-adducts for unambiguous identification of the respective organophosphorus compound. Moreover, MetProCys- and AspIleCys-tripeptide-disulfide-adducts were identified using peptide reference material that was synthesized exclusively for this purpose. Notably, detection of tripeptide-disulfide-adducts clearly showed the ability of thiol-containing leaving groups to open intramolecular disulfide bridges in proteins. Limits of detection for V-type nerve agents in plasma were determined according to the guidelines of the Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons and the applicability of the developed method to toxicologically relevant plasma concentrations was demonstrated.

Using the two compounds oxydemeton-*S*-methyl and its main biotransformation product demeton-*S*-methyl sulfone it was shown that the formation of disulfide-adducts does not only occur with nerve agents but also with organophosphorus pesticides. Moreover, in addition to HSA-disulfide-adducts it was also possible to detect disulfide-adducts with free cysteine/cystine for the first time. Finally, analyzing plasma samples of a genuine case of intoxication with oxydemeton-*S*-methyl the suitability of the described disulfide-adducts as biomarkers for verification of an alleged exposure to organophosphorus compounds was demonstrated.

# Literaturverzeichnis

- [1] G. Schrader. Die insektiziden Phosphorsäureester. *Angewandte Chemie*, 69:86–90, 1957.
- [2] K. Kim, O. G. Tsay, D. A. Atwood, D. G. Churchill. Destruction and detection of chemical warfare agents. *Chemical Reviews*, 111:5345–5403, 2011.
- [3] R. Black. Development, historical use and properties of chemical warfare agents. In: F. Worek, J. Jenner, H. Thiermann (Hrsg.), *Chemical warfare toxicology*, Band 1: *Issues in Toxicology*, S. 1–28. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2016.
- [4] M. Höfer. Chemische Kampfstoffe: Ein Überblick. *Chemie in unserer Zeit*, 36:148–155, 2002.
- [5] L. Szinicz. History of chemical and biological warfare agents. *Toxicology*, 214:167–181, 2005.
- [6] H. John, F. Worek, H. Thiermann. LC-MS-based procedures for monitoring of toxic organophosphorus compounds and verification of pesticide and nerve agent poisoning. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391:97–116, 2008.
- [7] H. Mückter. Allgemeine Toxikologie: Grundlagen der Toxikologie. In: F.-X. Reichl, J. Benecke, M. Benecke (Hrsg.), *Taschenatlas Toxikologie*, S. 4–18. Thieme, Stuttgart, 2009.
- [8] H. John, F. Balszuweit, K. Kehe, F. Worek, H. Thiermann. Toxicokinetic aspects of nerve agents and vesicants. In: R. C. Gupta (Hrsg.), *Handbook of toxicology of chemical warfare agents*, S. 817–856. Elsevier, Amsterdam, 2015.
- [9] D. Gunnell, M. Eddleston, M. R. Phillips, F. Konradsen. The global distribution of fatal pesticide self-poisoning: Systematic review. *BMC Public Health*, 7:357–371, 2007.
- [10] E. J. Mew, P. Padmanathan, F. Konradsen, M. Eddleston, S.-S. Chang, M. R. Phillips, D. Gunnell. The global burden of fatal self-poisoning with pesticides 2006–15: Systematic review. *Journal of Affective Disorders*, 219:93–104, 2017.
- [11] J. A. Vale. Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning. *Toxicology Letters*, 102/103:649–652, 1998.
- [12] B. Mackness, P. N. Durrington, M. I. Mackness. Human serum paraoxonase. *General Pharmacology*, 31:329–336, 1998.
- [13] C. Sams, H. J. Mason, R. Rawbone. Evidence for the activation of organophosphate pesticides by cytochromes P450 3A4 and 2D6 in human liver microsomes. *Toxicology Letters*, 116:217–221, 2000.
- [14] F. Eyer, D. M. Roberts, N. A. Buckley, M. Eddleston, H. Thiermann, F. Worek, P. Eyer. Extreme variability in the formation of chlorpyrifos oxon (CPO) in patients poisoned by chlorpyrifos (CPF). *Biochemical Pharmacology*, 78:531–537, 2009.
- [15] T. C. Kwong. Organophosphate pesticides: Biochemistry and clinical toxicology. *Therapeutic Drug Monitoring*, 24:144–149, 2002.

- [16] F. Worek, T. Wille, M. Koller, H. Thiermann. Toxicology of organophosphorus compounds in view of an increasing terrorist threat. *Archives of Toxicology*, 90:2131–2145, 2016.
- [17] B. Liebl. Spezielle Toxikologie: Biozide. In: F.-X. Reichl, J. Benecke, M. Benecke (Hrsg.), *Taschenatlas Toxikologie*, S. 200–203. Thieme, Stuttgart, 2009.
- [18] M. Jokanović. Medical treatment of acute poisoning with organophosphorus and carbamate pesticides. *Toxicology Letters*, 190:107–115, 2009.
- [19] P. Eyer. The role of oximes in the management of organophosphorus pesticide poisoning. *Toxicological Reviews*, 22:165–190, 2003.
- [20] F. Worek, H. Thiermann. The value of novel oximes for treatment of poisoning by organophosphorus compounds. *Pharmacology and Therapeutics*, 139:249–259, 2013.
- [21] F. Worek, H. Thiermann, L. Szinicz, P. Eyer. Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. *Biochemical Pharmacology*, 68:2237–2248, 2004.
- [22] P. W. Elsinghorst, F. Worek, H. Thiermann, T. Wille. Drug development for the management of organophosphorus poisoning. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 8:1467–1477, 2013.
- [23] R. D. Sheridan, A. P. Smith, S. R. Turner, J. E. H. Tattersall. Nicotinic antagonists in the treatment of nerve agent intoxication. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 98:114–115, 2005.
- [24] C. Rosenbaum, S. B. Bird. Non-muscarinic therapeutic targets for acute organophosphorus poisoning. *Journal of Medical Toxicology*, 6:408–412, 2010.
- [25] D. D. Haines, S. C. Fox. Acute and long-term impact of chemical weapons: Lessons from the Iran-Iraq War. *Forensic Science Review*, 26:97–114, 2014.
- [26] A. T. Tu. Basic information on nerve gas and the use of sarin by Aum Shinrikyo. *Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan*, 44:293–320, 1996.
- [27] Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons. Fact Sheet 1: Origins of the Chemical Weapons Convention and the OPCW, 2017. [https://www.opcw.org/fileadmin/OPCW/Fact\\_Sheets/English/Fact\\_Sheet\\_1\\_-\\_History.pdf](https://www.opcw.org/fileadmin/OPCW/Fact_Sheets/English/Fact_Sheet_1_-_History.pdf). Letzter Aufruf Mai 2018.
- [28] Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons. Convention on the prohibition of the development, production, stockpiling and use of chemical weapons and on their destruction (CWC): Article VIII. A. General Provisions, 2005. [https://www.opcw.org/fileadmin/OPCW/CWC/CWC\\_en.pdf](https://www.opcw.org/fileadmin/OPCW/CWC/CWC_en.pdf). Letzter Aufruf Mai 2018.
- [29] Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons. Fact Sheet 5: Three types of inspections, 2017. [https://www.opcw.org/fileadmin/OPCW/Fact\\_Sheets/English/Fact\\_Sheet\\_5\\_-\\_Inspections.pdf](https://www.opcw.org/fileadmin/OPCW/Fact_Sheets/English/Fact_Sheet_5_-_Inspections.pdf). Letzter Aufruf Mai 2018.
- [30] United Nations. United Nations mission to investigate allegations of the use of chemical weapons in the Syrian Arab Republic: Final report, 2013. <https://unoda-web.s3.amazonaws.com/wp-content/uploads/2013/12/report.pdf>. Letzter Aufruf Mai 2018.

- [31] H. John, M. J. van der Schans, M. Koller, H. E. T. Spruit, F. Worek, H. Thiermann, D. Noort. Fatal sarin poisoning in Syria 2013: Forensic verification within an international laboratory network. *Forensic Toxicology*, 36:61–71, 2018.
- [32] Nobel Media AB. Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons (OPCW) - Facts, 2014. [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/peace/laureates/2013/opcw-facts.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/peace/laureates/2013/opcw-facts.html). Letzter Aufruf Mai 2018.
- [33] Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 69:89–95, 2001.
- [34] G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres, R. M. Featherstone. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7:88–95, 1961.
- [35] F. Worek, P. Eyer, H. Thiermann. Determination of acetylcholinesterase activity by the Ellman assay: A versatile tool for in vitro research on medical countermeasures against organophosphate poisoning. *Drug Testing and Analysis*, 4:282–291, 2012.
- [36] M. Eddleston, P. Eyer, F. Worek, F. Mohamed, L. Senarathna, L. von Meyer, E. Juszcak, A. Hittarage, S. Azhar, W. Dissanayake, M. H. R. Sheriff, L. Szinicz, A. H. Dawson, N. A. Buckley. Differences between organophosphorus insecticides in human self-poisoning: A prospective cohort study. *The Lancet*, 366:1452–1459, 2005.
- [37] M. Eddleston, P. Eyer, F. Worek, M. H. R. Sheriff, N. A. Buckley. Predicting outcome using butyrylcholinesterase activity in organophosphorus pesticide self-poisoning. *QJM: An International Journal of Medicine*, 101:467–474, 2008.
- [38] R. M. Black, R. W. Read. Biological markers of exposure to organophosphorus nerve agents. *Archives of Toxicology*, 87:421–437, 2013.
- [39] H. Tsuchihashi, M. Katagi, M. Nishikawa, M. Tatsuno. Identification of metabolites of nerve agent VX in serum collected from a victim. *Journal of Analytical Toxicology*, 22:383–388, 1998.
- [40] G. Reiter, J. Mikler, I. Hill, K. Weatherby, H. Thiermann, F. Worek. Simultaneous quantification of VX and its toxic metabolite in blood and plasma samples and its application for in vivo and in vitro toxicological studies. *Journal of Chromatography B*, 879:2704–2713, 2011.
- [41] E. S. Peeples, L. M. Schopfer, E. G. Duysen, R. Spaulding, T. Voelker, C. M. Thompson, O. Lockridge. Albumin, a new biomarker of organophosphorus toxicant exposure, identified by mass spectrometry. *Toxicological Sciences*, 83:303–312, 2005.
- [42] J. L. S. Sporty, S. W. Lemire, E. M. Jakubowski, J. A. Renner, R. A. Evans, R. F. Williams, J. G. Schmidt, M. J. van der Schans, D. Noort, R. C. Johnson. Immunomagnetic separation and quantification of butyrylcholinesterase nerve agent adducts in human serum. *Analytical Chemistry*, 82:6593–6600, 2010.
- [43] M. D. Carter, B. S. Crow, B. G. Pantazides, C. M. Watson, J. D. Thomas, T. A. Blake, R. C. Johnson. Direct quantitation of methyl phosphonate adducts to human serum butyrylcholinesterase by immunomagnetic-UHPLC-MS/MS. *Analytical Chemistry*, 85:11106–11111, 2013.

- [44] H. John, F. Breyer, C. Schmidt, B. Mizaikoff, F. Worek, H. Thiermann. Small-scale purification of butyrylcholinesterase from human plasma and implementation of a  $\mu$ LC-UV/ESI MS/MS method to detect its organophosphorus adducts. *Drug Testing and Analysis*, 7:947–956, 2015.
- [45] S.-J. Ding, J. Carr, J. E. Carlson, L. Tong, W. Xue, Y. Li, L. M. Schopfer, B. Li, F. Nachon, O. Asojo, C. M. Thompson, S. H. Hinrichs, P. Masson, O. Lockridge. Five tyrosines and two serines in human albumin are labeled by the organophosphorus agent FP-biotin. *Chemical Research in Toxicology*, 21:1787–1794, 2008.
- [46] R. M. Black, J. M. Harrison, R. W. Read. The interaction of sarin and soman with plasma proteins: The identification of a novel phosphorylation site. *Archives of Toxicology*, 73:123–126, 1999.
- [47] N. H. Williams, J. M. Harrison, R. W. Read, R. M. Black. Phosphylated tyrosine in albumin as a biomarker of exposure to organophosphorus nerve agents. *Archives of Toxicology*, 81:627–639, 2007.
- [48] H. John, F. Breyer, J. O. Thumfart, H. Höchstetter, H. Thiermann. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for detection and identification of albumin phosphorylation by organophosphorus pesticides and G- and V-type nerve agents. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398:2677–2691, 2010.
- [49] J. V. Sancho, O. J. Pozo, F. Hernández. Direct determination of chlorpyrifos and its main metabolite 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in human serum and urine by coupled-column liquid chromatography/electrospray-tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 14:1485–1490, 2000.
- [50] J. N. Smith, J. Wang, Y. Lin, E. M. Klohe, C. Timchalk. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in rat saliva after chlorpyrifos administration. *Toxicological Sciences*, 130:245–256, 2012.
- [51] D. B. Barr, W. E. Turner, E. DiPietro, P. C. McClure, S. E. Baker, J. R. Barr, K. Gehle, R. E. Grissom, R. Bravo, W. J. Driskell, D. G. Patterson, R. H. Hill, L. L. Needham, J. L. Pirkle, E. J. Sampson. Measurement of p-nitrophenol in the urine of residents whose homes were contaminated with methyl parathion. *Environmental Health Perspectives*, 110:1085–1091, 2002.
- [52] F. Eyer, V. Meischner, D. Kiderlen, H. Thiermann, F. Worek, M. Haberkorn, N. Felgenhauer, T. Zilker, P. Eyer. Human parathion poisoning: A toxicokinetic analysis. *Toxicological Reviews*, 22:143–163, 2003.
- [53] D. Noort, A. G. Hulst, A. van Zuylen, E. van Rijssel, M. J. van der Schans. Covalent binding of organophosphorothioates to albumin: A new perspective for OP-pesticide biomonitoring? *Archives of Toxicology*, 83:1031–1036, 2009.
- [54] D. Noort, A. G. Hulst, L. P. A. de Jong, H. P. Benschop. Alkylation of human serum albumin by sulfur mustard in vitro and in vivo: Mass spectrometric analysis of a cysteine adduct as a sensitive biomarker of exposure. *Chemical Research in Toxicology*, 12:715–721, 1999.

- [55] F. Gandor, M. Gawlik, H. Thiermann, H. John. Evidence of sulfur mustard exposure in human plasma by LC-ESI-MS-MS detection of the albumin-derived alkylated HETE-CP dipeptide and chromatographic investigation of its cis/trans isomerism. *Journal of Analytical Toxicology*, 39:270–279, 2015.
- [56] H. John, M. Siegert, F. Gandor, M. Gawlik, A. Kranawetvogl, K. Karaghiosoff, H. Thiermann. Optimized verification method for detection of an albumin-sulfur mustard adduct at Cys<sup>34</sup> using a hybrid quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometer after direct plasma proteolysis. *Toxicology Letters*, 244:103–111, 2016.

# Abbildungsverzeichnis

1	Grundsätzlicher Aufbau einer phosphororganischen Verbindung (Schrader-Formel) nach [1] . . . . .	10
2	Wirkmechanismus phosphororganischer Verbindungen . . . . .	13
3	Mögliche Reaktionen am aktiven Zentrum der durch phosphororganische Verbindungen gehemmten AChE nach [20] . . . . .	14

# Tabellenverzeichnis

1	Einteilung phosphororganischer Verbindungen in Pestizide und Nerven- kampfstoffe mit ausgewählten Beispielstrukturen . . . . .	11
2	Wichtige Biomarker zum Nachweis einer Vergiftung mit dem Nervenkampf- stoff VX . . . . .	18