

Ein Sulfoxid-basierendes isobares Derivatisierungs-Reagenz für präzise quantitative Massenspektrometrie

Michael Stadlmeier^{[a],+}, Jana Bogena^{[a],+}, Miriam Wallner^{[a],+}, Martin Wühr^[b] and Thomas Carell^{[a],*}

^[a] Center for Integrated Protein Science, Department Chemie, Ludwig-Maximilians-Universität München, Butenandtstr. 5-13, 81377 Munich, Germany

^[b] Department of Molecular Biology & the Lewis-Sigler Institute for Integrative Genomics, Princeton University, Princeton, NJ 08544, USA

* Korrespondenz an Thomas Carell, E-Mail: Thomas.Carell@lmu.de

^[+] Diese Autoren haben gleichermaßen zu dieser Arbeit beigetragen.

Diese Arbeit wurde am 05.03.2018 in Angewandte Chemie, Band 130(11), 3008-3013 veröffentlicht.

Abstract: Die moderne Proteomik verlangt nach Reagenzien für eine akkurate Quantifizierung von Peptiden in komplexen Proben. Peptide werden üblicherweise mit isobaren Markierungen versehen, die aus einem Massenausgleicher und einem Reporter bestehen, welche in der Gasphase gespalten werden. Eine geschickte Verteilung der stabilen Isotope liefert mehrere Reagenzien mit identischem Molekulargewicht, jedoch mit einer abweichenden Masse der Reportergruppen, was die relative Quantifizierung mehrerer Proben in einer einzigen Messung ermöglicht. Gegenwärtige Reagenzien benötigen eine hohe Fragmentierungsenergie für die Spaltung, was zu einer unvollständigen Fragmentierung und infolgedessen zu einer Minderung der Signalintensität führt. In dieser Arbeit stellen wir ein neues isobares Derivatisierungs-Reagenz vor, in dem der Massenausgleicher und der Reporter über eine Sulfoxidgruppe verbunden sind, was basierend auf einer Sulfoxid-Pyrolyse zu einer einfachen und asymmetrischen Spaltung bei niedriger Energie führt. Das neue Design unseres Reagenzes zeigt eine signifikante Verbesserung der Spaltung, was zu intensiveren Signalen der komplementären Ionen führt und somit auch die Analyse der komplementären Ionen-Cluster ermöglicht.

Nach der Entwicklung neuer Methoden zur Genomsequenzierung, welche eine Untersuchung des menschlichen Genoms in nur wenigen Stunden ermöglichen,^[1] erleben wir die Entstehung neuer massenspektrometrischer Methoden, die eine Erforschung des vollständigen Proteoms von Zellen und Geweben möglich machen.^[2-4] Das Proteom ist eine Bezeichnung für die Gesamtheit aller Proteine in einer Probe, und folglich ist der Unterschied von Proteomen zwischen Zell- und in unterschiedlichen Gewebetypen enorm.^[5] Proteomik-Daten liefern somit fingerabdruckgleiche Informationen über den zellulären Zustand und potentiell vorhandene Krankheitsstadien.^[6] Um einen tieferen Einblick in das Proteom biologischer Systeme zu erhalten, ist es notwendig, quantitative Informationen über die individuellen Proteinlevel in unterschiedlichen Proben zu erlangen. Heutzutage wird dies mit Hilfe der Massenspektrometrie erreicht. Nachdem eine präzise Quantifizierung intakter Proteine schwierig ist, müssen Proteome zunächst enzymatisch verdaut (trypsiniert) werden, um die jeweiligen Peptide zu erhalten. Für die Quantifizierung dieser Peptide, werden Methoden wie metabolische Markierungen,^[7-8] die markierungsfreie Quantifizierung^[9] oder isobare Markierungsexperimente angewandt.^[10-11] Da man mit isobaren Markierungsexperimenten sogar kleinste Unterschiede von Peptidmengen analysieren kann und viele verschiedene Proben in einer einzigen Messung verglichen werden können, ist es die am häufigsten genutzte Quantifizierungsmethode.^[12] Ein Experiment, welches die typische Vorgehensweise veranschaulicht, ist in Abb. 1A dargestellt.

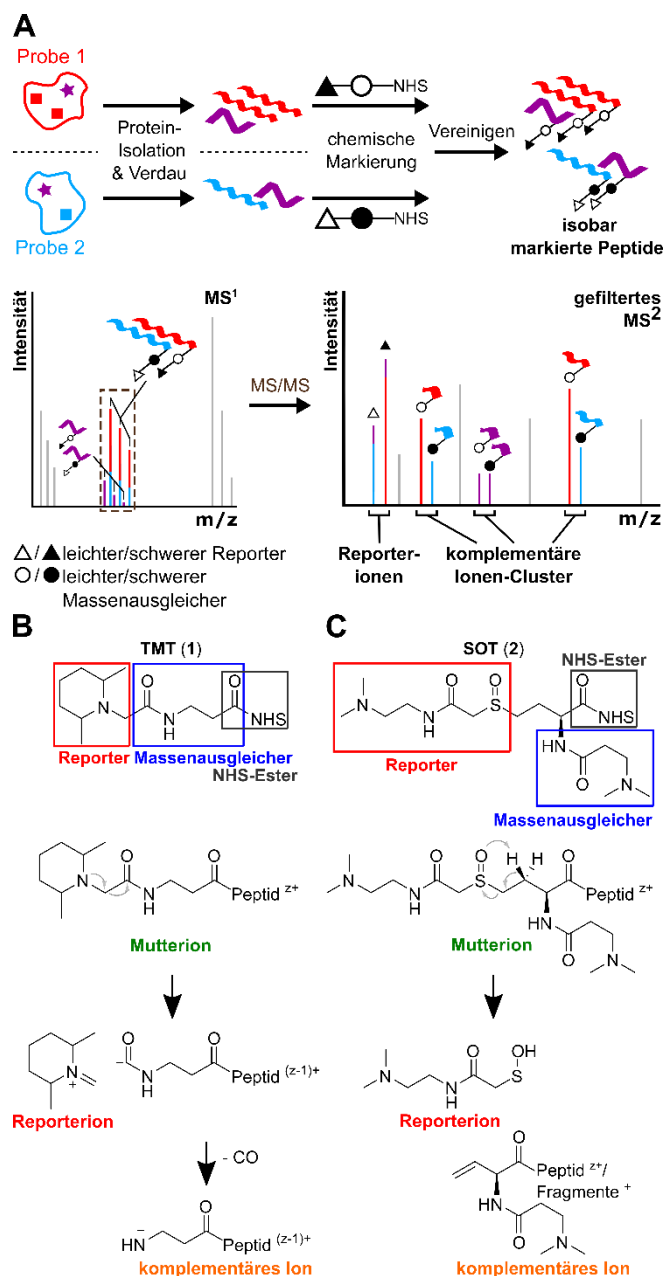


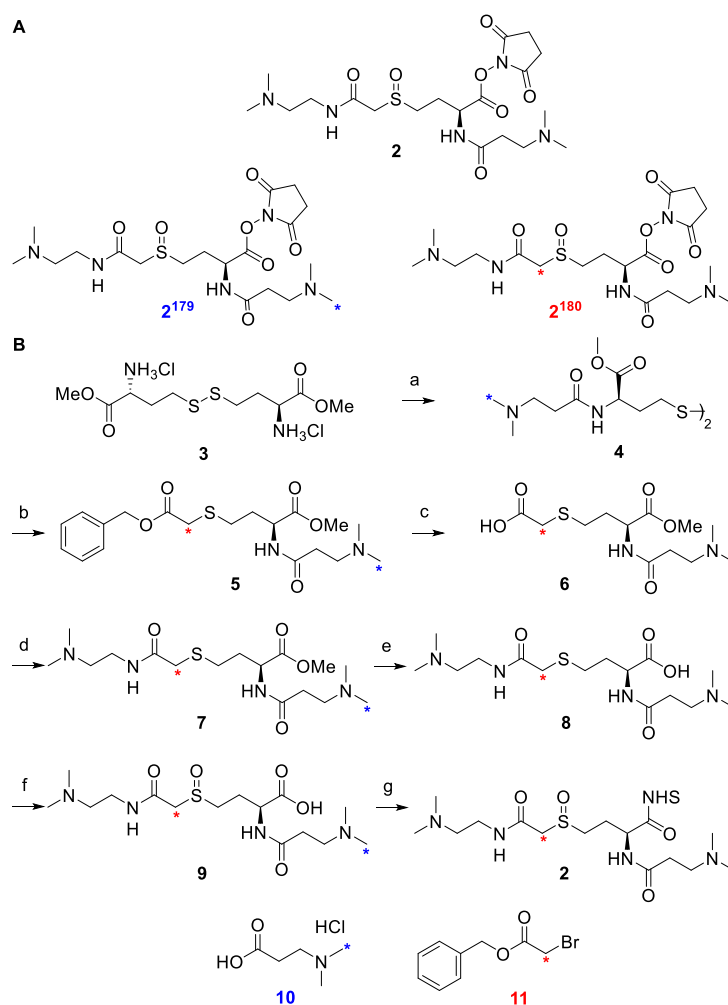
Abbildung 1. A) Isobares Markierungsexperiment für quantitative Proteomik. Die Proben werden einzeln mit Isotopologen der Reagenzien **1** oder **2** derivatisiert und für LC-MS²-Experimente kombiniert. Fragmentierungen in der Gasphase bilden sowohl Reporter- als auch komplementäre Ionen für die relative Quantifizierung der Proben. Das Verhältnis der Reporterionen ist durch co-isolierte Peptide (lila) verzerrt. Die Cluster von komplementären Ionen können ohne solch eine Verzerrung analysiert werden. B) Derzeitig verwendetes TMT (**1**) Reagenz. Fragmentierung führt zu einer negativen Ladung auf dem Massenausgleicher-Teil, was den gesamten Ladungszustand der komplementären Ionen verringert. C) *SulfOxide Tag* (SOT, **2**), vorgestellt in dieser Publikation, welches eine ladungsneutrale Fragmentierung besitzt. So werden alle Ladungen auf den komplementären Ionen beibehalten, was die Fragmentierung erleichtert.

Die Proteome zweier Proben werden isoliert, verdaut und die Peptide anschließend mit einem isobaren Markierungs-Reagenz wie dem *Tandem Mass Tag* (TMT) **1** (Fig. 1B) oder dem von uns vorgestellten neuen Derivatisierungs-Reagenz **2** (Fig. 1C) markiert. Die vorbereiteten, markierten Peptidmischungen werden vereint und mittels HPLC-MS¹³ oder sogar über CE-MS analysiert.^[14-15] Während der Auftrennung besitzen die gleichen Peptide aus den zwei Proben (blau und rot, Abb. 1) aufgrund der Isobarizität der Markierungen dieselbe Retentionszeit. Demzufolge erreichen sie das Massenspektrometer zur gleichen Zeit, was zu einem ununterscheidbaren m/z -Wert im MS^1 -Spektrum führt. Dies ermöglicht die Massenspektrometrie-basierte Identifizierung durch Wahl eines einzelnen Mutterions für die Fragmentierung (MS^2). Die Spaltung des isobaren Labels generiert zwei nun unterschiedliche Reporterionen (Δ , Abb. 1A), welche eine relative Quantifizierung ermöglichen. Die Sensitivität der Methode ist von der Spaltungseffizienz abhängig. Neben dem Reporterion entsteht pro Peptid auch ein Massenausgleicher-Peptid-Konjugat, das komplementäre Ion. Da der gebundene Massenausgleicher das charakteristische Isotopenmuster des isobaren Derivatisierungs-Reagenzes aufweist, ist auch eine Quantifizierung über das komplementäre Ionen-Cluster möglich.^[16] Dies hat den Vorteil, dass co-eluierende Peptide (lila), welche Reporterionen bilden die von den Reporterionen von Interesse ununterscheidbar sind, das Signal nicht stören können. Dieses als Verzerrung der gemessenen Verhältnisse bekannte Problem beeinträchtigt oftmals eine präzise Quantifizierung auf Grundlage der Reporterionen.^[17] Wie bereits erwähnt, ist die Sensitivität von der Spaltungseffizienz abhängig, welche bei aktuellen Reagenzien nicht ausreichend ist.^[16]

In dieser Arbeit berichten wir von der Entwicklung eines neuen *SulfOxide Tag* Reagenzes **2** (SOT, Schema 1 A), welches effizienter spaltet und somit die Quantifizierung verbessert. Zudem trägt das Reagenz zwei basische *tert*-Aminogruppen, welche in der Gasphase protoniert vorliegen. Somit wird die Bildung einer neutralen Spezies während der Spaltung verhindert und die Ladungsdichte erhöht, was die Fragmentierung begünstigt. Das Design des SOT-Reagenzes **2** ermöglicht die Einführung von bis zu acht schweren stabilen Isotopen in die Struktur unter Erhaltung der Isobarizität, sowie der Entstehung von Reporterionen mit $\Delta m/z = 1$. Das Design wurde so gewählt, um die parallele massenspektrometrische Quantifizierung von neun verschiedenen Proben in einer einzigen Messung zu ermöglichen. Die theoretisch geplanten Strukturen dieses 9-Plex Reagenzes sind in der SI abgebildet (unterstützende Abb. 3).

Die Synthese von Reagenz **2** sowie von zwei isobaren isotonenmarkierten Derivate (**2**¹⁷⁹ und **2**¹⁸⁰), die sich im Molekulargewicht des Reporters unterscheiden (179 Da and 180 Da), sind in Schema 1B abgebildet. Unseres Wissens nach stimmen die Massen der erzeugten Reporterionen nicht mit Massen von Immonium- oder anderen häufig beobachteten Fragmentationen überein. Die Synthese (SI) beginnt mit dem Methyl ester des Homocystin-Dimers **3**, welcher zunächst mit Dimethylaminopropionsäure in das Bisamid **4** überführt wird. Reduktion des Disulfids und Alkylierung des Thiols mit Benzylbromoacetat liefern die zentrale Zwischenstufe **5**. Die Spaltung des Benzylesters zu **6** und die Reaktion von **6** mit 1,1-Dimethylethylendiamin führen zu Bisamid **7**. Die Verseifung des Methyl esters in **7** zu **8**, Oxidation des Sulfids zum Sulfoxid **9** und Umwandlung der Säure liefern Aktivester **2**. Um die Isotopologen zu erhalten, wurde in einer zweiten Synthese anstelle der Dimethylaminopropionsäure eine ähnliche Verbindung **10** verwendet, in welcher eine Methylgruppe ein ¹³C Atom (SI) trägt. In einer dritten Synthese wurde ¹³C-markiertes Benzylbromoacetat **11** verwendet (SI). Auf diesem Wege wurden die entsprechenden Reagenzien **2**¹⁷⁹ und **2**¹⁸⁰ (Schema 1A) in ähnlichen Ausbeuten erhalten. Die Synthese dauert in etwa eine Woche und die Gesamtausbeute beträgt ca. 12%. Bei -20 °C ist die Lagerung des Reagenzes in reiner Form oder sogar in einer Stocklösung (DMSO) für mehrere Wochen möglich.

Um die Fragmentierungseigenschaften von SOT **2** zu analysieren, haben wir ein *HEK*-Lysat nach einem Standardprotokoll (SI) verdaut, welches alle entsprechenden Peptide der translatierten Proteine enthält. Die erhaltene komplexe Peptidmischung (P) wurde in zwei Teile geteilt. Während ein Teil mit Reagenz **2**¹⁷⁹ (P-**2**¹⁷⁹) behandelt wurde, wurde der andere Teil mit **2**¹⁸⁰ reagiert, um P-**2**¹⁸⁰ zu erhalten (pH = 8.5, 150 mM Triethylammonium Bikarbonat Puffer, 1.5 mg **2**¹⁷⁹ oder **2**¹⁸⁰, 60 min). Nicht reagiertes Reagenz **2** wurde mit Hydroxylamin gequenchet. Anschließend wurden die markierten Proben {P-**2**¹⁷⁹+P-**2**¹⁸⁰} in einem 1:1 Verhältnis gemischt, entsalzt und gemäß bekannter Vorschrift konzentriert.^[18]



Schema 1. A) Darstellung des neuen Reagenzes **2** und der Isotopologen **2**¹⁷⁹ und **2**¹⁸⁰. B) a) 3-(Dimethylamino)propionsäure Hydrochlorid, NEt₃, HOBT, 60 °C, 2 h, 85%; b) Über zwei Stufen i) TCEP·HCl, NaHCO₃, H₂O/DMF (4:1), r.t., 10 min; ii) Benzylbromoacetat, r.t., 2 h, 95%; c) 10% Ameisensäure in MeOH, 100 wt% Pd black, 40 °C, 2 h, 81%; d) *N,N*-Dimethylethan-1,2-diamin, DIPEA, PyBOP, DMF, 40 °C, 1 h, 73%; e) LiOH, MeOH/H₂O (2.5:1), r.t., 1 h, quant.; f) pH = 2, *m*CPBA, H₂O, r.t., 20 min, 75%; g) NHS-TFA, Pyridin, DMF, r.t., 2 h, 35%. 179 Da und 180 Da sind die Molekulargewichte der entstehenden Reporter Ionen.

Als Vergleich haben wir das gleiche Experiment mit den kommerziell erhältlichen, isotopenmarkierten TMT-Reagenzien **1** (Duplex) nach den Herstelleranweisungen durchgeführt, um die Mischung {P-TMT¹²⁶ + P-TMT¹²⁷} zu erhalten. Die Peptid-Mischungen {P-2¹⁷⁹ + P-2¹⁸⁰} und {P-TMT¹²⁶ + P-TMT¹²⁷} wurden anschließend durch nanoHPLC-MS²-Experimente gemessen und die Daten wurden durch die MaxQuant-Software und ein selbst entwickeltes Software-Paket analysiert. (Unterstützende Abbildung 1&2).^[19] Die erhaltenen Daten sind in Abb. 2 und Abb. 3 dargestellt. Als ein Beispiel zeigt Abb. 2A die Spaltung des SOT-Reagenz **2** nach der Reaktion mit dem Peptid DLPEHAVLK²⁺ (welches zwei Markierungen trägt) in der komplexen Mischung im direkten Vergleich mit dem entsprechenden, TMT-markierten Peptid. Wir haben die Messungen bei einer normalisierten Kollisionsenergie von 28 % HCD (*higher-energy collisional dissociation*) durchgeführt, welche ideal zur Fragmentierung von Peptiden für deren Identifikation geeignet ist. Deutlich erkennbar erzeugt das SOT-Reagenz **2** Reporterionen höherer Intensität und zusätzlich beobachten wir mehr Fragmentierung, was darauf hinweist, dass das Reagenz die Peptidfragmentierung fördert. Abb. 2B zeigt eine Analyse aller Peptide, die in der SOT- und TMT-markierten Probe identifiziert wurden und hier sehen wir, dass die relative Reporterionen-Intensität in der Mehrzahl der MS²-Spektren bis zu 70-100 % beträgt, was ein Novum darstellt. Dies ermöglicht die einfache, relative Quantifizierung über die Bestimmung der Reporterionen-Verhältnisse mit verfügbaren Software-Paketen. Im Vergleich dazu produzieren TMT-markierte Peptide bei dieser HCD-Energie Reporterionen von niedrigerer relativer Intensität. Abb. 2C zeigt die Ladungszustände der intakten markierten Peptide vor der Fragmentierung (Mutterionen). In Übereinstimmung mit unserem Design sehen wir, dass das SOT-Reagenz **2** markierte Peptide mit viel höheren Ladungszuständen bildet. Vor allem haben über 65 % aller markierten Peptide einen Ladungszustand von mindestens +3. Diese hohe Ladungsdichte erleichtert die nachfolgende Fragmentierung, was zur Bildung von mehr komplementären Ionen führt.

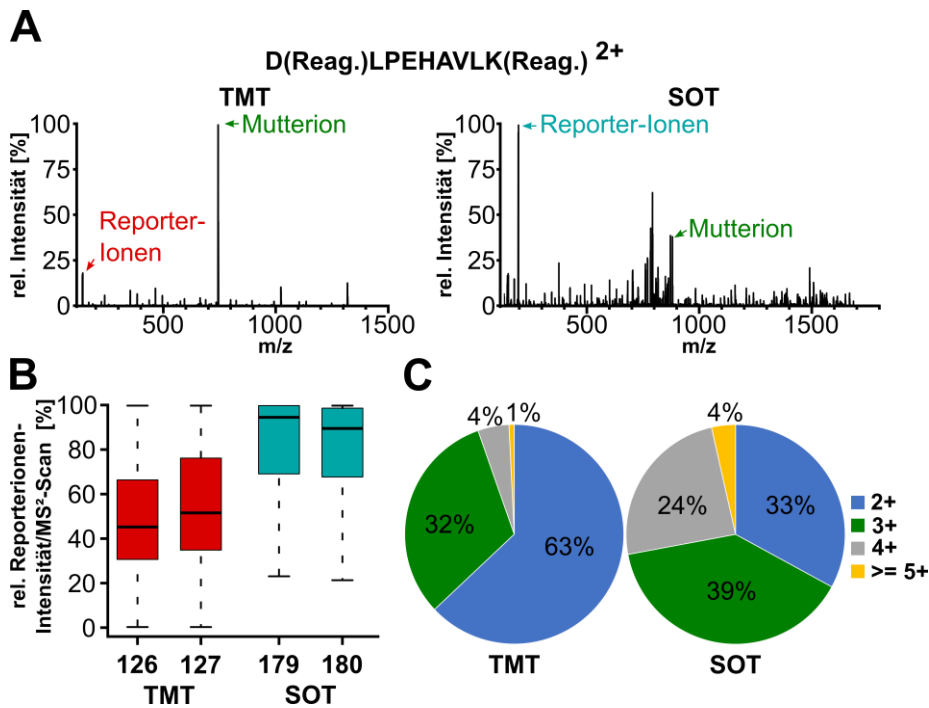


Abbildung 2. A) Vergleich der Fragmentierungseffizienz zwischen TMT (**1**) und SOT (**2**) an einem Peptid. Bei einer normalisierten Kollisionsenergie von 28 % HCD fragmentieren die SOT-markierten Peptide leichter und führen zu einem hohen Signal der Reporterionen. Reag. = reagiertes Reagenz. B.) Statistische Analyse der relativen Reporterionen-Intensitäten im MS²-Experiment. Im Falle von SOT (**2**) besitzen die Reporterionen eine exzellente Sichtbarkeit, was die Quantifizierung über die Reporterionen vereinfacht. Im Gegensatz dazu bildet TMT (**1**) weniger intensive Reporterionen. C) Ladungszustandsverteilung von Mutterion-Peptiden, welche mit dem TMT (**1**) oder SOT (**2**) Duplex markiert sind. Wird das SOT-Reagenz verwendet, kommen höhere Ladungszustände häufiger vor, was durch eine höhere Ladungsdichte zu einer besseren Fragmentierung führen sollte.

Obwohl die Reporterionen-Intensität die Bestimmung der relativen Verhältnisse zwischen Peptiden aus P-2¹⁸⁰ und P-2¹⁷⁹ ermöglicht, ist es wünschenswert, über die komplementären Ionen-Cluster zu quantifizieren, welche aus den Massenausgleicher-Peptid-Konjugaten bestehen.^[16] Weil diese Massenausgleicher-Peptid-Konjugate innerhalb des Massenspektrometers weiter fragmentieren, entsteht eine große Anzahl an komplementären Ionen-Clustern, welche alle zur Quantifizierung verwendet werden können. Dies führt zu einer höheren Datendichte und reduziert die Verzerrung der gemessenen Verhältnisse, weil die komplementären Ionen sequenzspezifisch und damit unterscheidbar sind, im Gegensatz zu den Reporterionen, welche für alle Peptide gleich sind. In unserem Experiment beobachten wir, dass das SOT-Reagenz **2** ideale Eigenschaften für solch eine komplementäre Ionen-Cluster Analyse besitzt. Bei der Untersuchung der markierten Peptid-Fragmentionen konnten wir beobachten, dass 58 % dieser Fragmente noch das intakte Reagenz **2** beinhalteten, wohingegen 42 % die Reportergruppe verloren haben, was zur Entstehung der komplementären Ionen-Cluster führt (Abb. 3A).

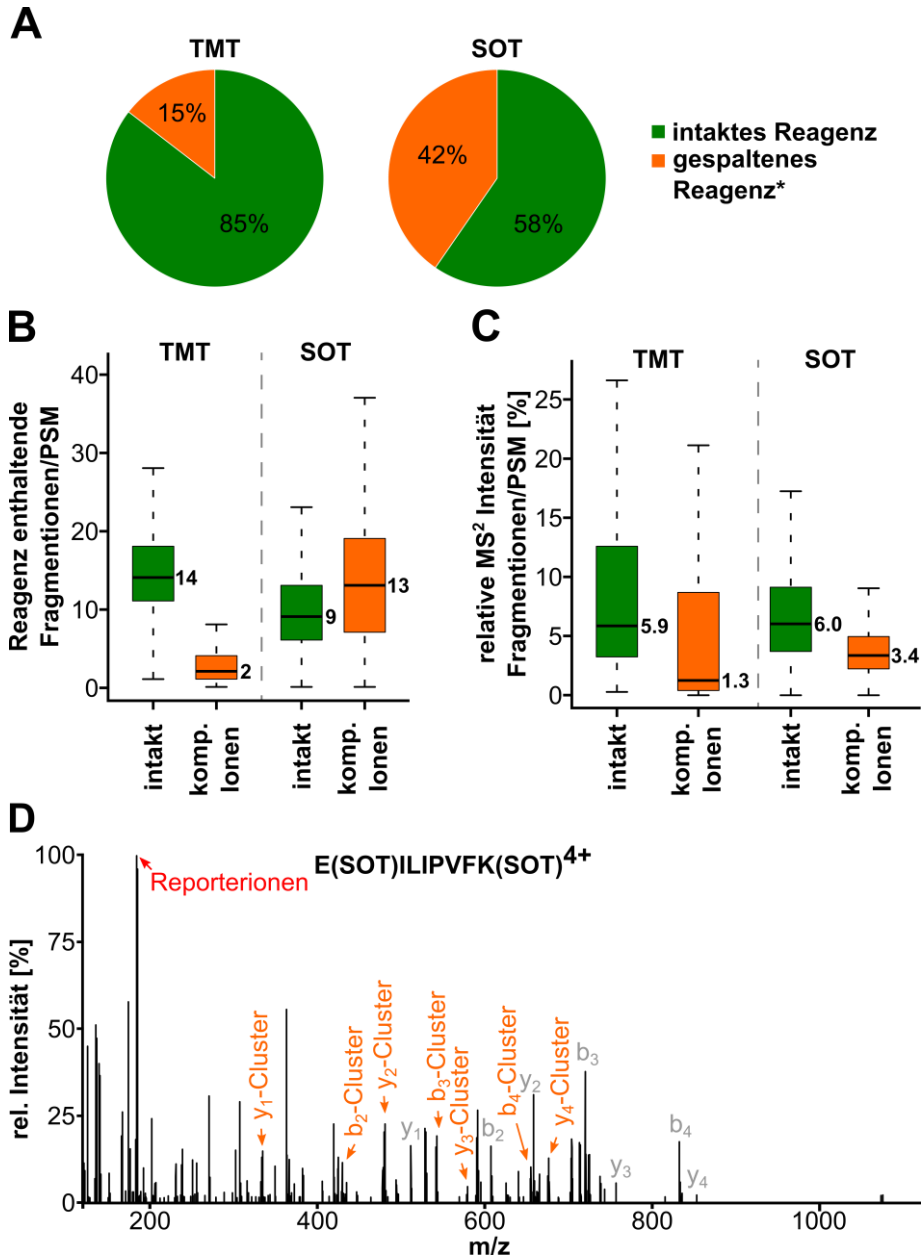


Abbildung 3. A) Verhältnis aller identifizierten Fragmentationen, welche entweder das intakte Reagenz (Reporter + Massenausgleicher, grün) enthalten oder in welchen die Reporterionen abgespalten wurden, was zur Bildung von komplementären Ionen-Clustern führt (gespaltenes Reagenz, orange). *Weil ein intaktes Reagenz nur im Falle von SOT (2) zur Bildung von zwei gespaltenen Fragmenten führt, wurde die Anzahl der Fragmente, die ein gespaltenes Reagenz enthalten, durch zwei geteilt, um einen Vergleich mit den TMT-Daten zu ermöglichen. B) Statistische Analyse der Anzahl von markierten Fragmentationen pro Peptidzuordnung pro Spektrum (*peptide spectral match*, PSM). Mit SOT-markierte Peptide zeigen einen deutlichen Anstieg von komplementären Ionen pro Spektrum im Vergleich zu TMT-markierten Peptiden, nämlich im Durchschnitt 6–7 komplementäre Ionen-Cluster. C) Statistische Analyse der relativen MS²-Scan Intensitäten der markierten Fragmentationen pro PSM. Der Median der komplementären Ionen-Cluster Signalintensitäten ist für SOT-markierte Peptide im Vergleich zu TMT-markierten Peptiden erhöht. D) Beispielspektrum des markierten Peptids EILIPVFK⁴⁺, welches die Reporterionen (rot), sieben komplementäre Ionen-Cluster (orange) und einige der für die Identifikation verwendeten Fragmentationen (grau) zeigt.

Dieses ausgeglichene Verhältnis erlaubt die gleichzeitige Identifikation der (intakten) Peptide mit geläufigen Datenbanksuche-Algorithmen und Quantifizierung über die reichlich gebildeten komplementären Ionen-Cluster. Im Falle von TMT ist die Fragmentierung signifikant geringer und nur 15 % aller markierten Fragmentationen werden gespalten. Dies trifft auch zu, wenn berücksichtigt wird, dass die komplementären Ionen des TMT-Duplex ununterscheidbar sind, weil diese während der Fragmentierung CO (welches die Isotopenmarkierung enthält) verlieren. Abb. 3B zeigt, dass das SOT-Reagenz 2 für die spätere Quantifizierung im Durchschnitt 13 Peptid-Massenausgleicher-Fragmente aus jedem Mutterion bildet, was 6–7 komplementären Ionen-Clustern entspricht. Mit SOT markierte Peptide bilden nicht nur mehr komplementäre Ionen im Vergleich zu TMT markierten Peptiden, sondern auch der Median der relativen Intensitäten der komplementären Ionen in den jeweiligen MS²-Spektrern ist im Vergleich höher (Abb. 3C). Ein Beispielspektrum ist in Abb. 3D gezeigt. Die Signale für die Reporterionen (rot) und für sieben komplementäre Ionen-Cluster (orange) sind deutlich mit hohen relativen Intensitäten zu sehen. Zur Peptididentifikation sind mehrere Ionen hoher Intensität verfügbar (grau). Obwohl die Anzahl an aufgenommenen MS²-Spektrern für die SOT- und TMT-Proben vergleichbar waren (42169 für SOT, 46062 für TMT), war die Peptididentifikationsrate für SOT markierte Peptide niedriger (20 % für SOT, 35 % für TMT).

Um zu untersuchen, ob unser neues Reagenz die Verzerrung der gemessenen Verhältnisse bei der Quantifizierung verringert, führten wir ein Experiment durch, in welchem eine 1:1 markierte Mischung von HEK-Lysat als Hintergrund diente. In diesen Hintergrund wurde in geringer Menge eine Mischung von markierten Rinderserums-Albumin (BSA) in einem Verhältnis von 4:1 gegeben (Abb. 4A). Dies stellt sicher, dass nur eine kleine Menge von BSA-Peptiden in einem großen Hintergrund von 1:1 markierten, humanen Peptiden für Selektion und Fragmentierung ausgewählt werden. Dies sollte zu einer großen Verzerrung der gemessenen Verhältnisse führen. Wie bereits in ähnlichen Datensätzen mit starker Verzerrung beobachtet wurde,^[16] liegt der Median für die normalisierten Reporterionen-Verhältnisse der BSA-Peptide bei 1.15 im Falle der SOT-Probe und bei 1.11 im Falle der TMT-Probe, was die massive Verzerrung der gemessenen Verhältnisse Richtung 1:1 zeigt (Abb. 4B). Als nächstes untersuchten wir den selben SOT-Datensatz in Bezug auf die komplementären Ionen-Cluster der BSA-Peptide.

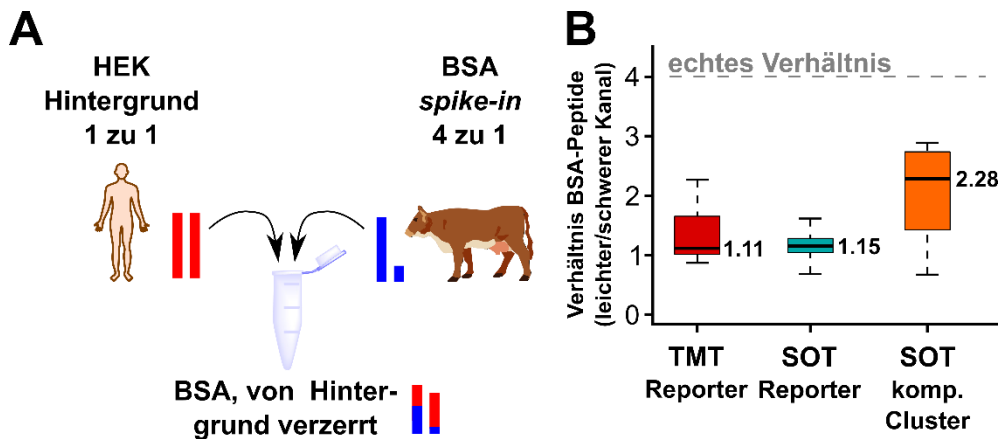


Abbildung 4. A) Experiment, welches die Quantifizierung eines Proteins mit starker Verzerrung des gemessenen Verhältnisses zeigt. HEK-Lysat wurde markiert und im Verhältnis von 1:1 gemischt, um als Hintergrund zu dienen. Rinderserums-Albumin (BSA) wurde markiert und in einem Verhältnis von 4:1 zum Hintergrund hinzugefügt. Die Reporterionen-Intensitäten von BSA-Peptiden sind in der Probe stark verzerrt. B) Ergebnisse der Quantifizierung der gemessenen BSA-Peptide. Der Median der Reporterionen-Intensitäten für die TMT- als auch die SOT-Probe zeigen eine starke Verzerrung, was den Eindruck eines Verhältnisses von nahezu 1:1 vermittelt. Die Analyse über die komplementären Ionen-Cluster führt zu einem höheren und dadurch verbesserten Wert für das BSA-Peptid Verhältnis. Somit reduziert die komplementäre Ionen-Cluster Analyse mit SOT die Verzerrung der Verhältnisse.

In 17 quantifizierten Peptiden wurden 155 komplementäre Ionen-Cluster detektiert und für die Quantifizierung herangezogen. Die Analyse derer Intensitäten lieferte ein normalisiertes Verhältnis von 2.3:1 (Median). Das so bestimmte Verhältnis ist um den Faktor 2 näher an dem erwarteten 4:1 Verhältnis, was den Vorteil der SOT komplementären Cluster-Analyse (SOT^c) verdeutlicht.

Zusammengefasst berichten wir über das Design eines neuen isobaren Markierungsreagenzes, welches die effiziente, gleichzeitige Bildung von Reporterionen und komplementären Ionen-Clustern für die Peptidquantifizierung ermöglicht. Das Reagenz hilft dabei, Quantifizierungsfehler durch die Verzerrung der gemessenen Verhältnisse zu verringern. Besonders attraktiv ist die effiziente Bildung von komplementären Ionen-Clustern, welche durch die Spaltung des Reagenzes und des Peptid-Rückgrats entstehen. Diese Ionen-Cluster erlauben es, mehrere Quantifizierungspaare pro Spektrum zu verwenden. Des Weiteren erwarten wir, dass wegen der sequenzspezifischen Fragmentierung die resultierenden Quantifizierungen im Vergleich zur Verwendung des komplementären Ionen-Clusters des intakten Peptids noch robuster gegen Interferenz sind. Dies ermöglicht die genauere Bestimmung von relativen Peptid- und somit Protein-Verhältnissen auch in komplexen Proben und könnte besonders attraktiv für zielgerichtete Multiplex-Ansätze sein.^[20] Die wichtigsten Eigenschaften des SOT-Reagenz **2** sind die gleichzeitige Bildung der Reporterionen und komplementären Ionen-Cluster sowie dass durch die Einführung mehrerer *tert*-Aminogruppen die erwarteten, höheren Ladungszustände erzeugt werden, welche zu einer besseren Peptidfragmentierung führen. Ein derzeitiger Nachteil ist, dass mit dem SOT-Reagenz weniger Peptide identifiziert werden. Diese niedrigere Identifikationsrate ist sicherlich durch die derzeit verfügbare Software zu erklären, welche noch nicht für die Verwendung des SOT-Reagenz optimiert ist. Zusätzlich erhöht das Reagenz den Ladungszustand, was auch ein limitierender Faktor sein könnte. Softwareoptimierungen und die Synthese eines Reagenzes, welches auf eine tertiäre Aminogruppe verzichtet, können diese Probleme lösen. Im Moment wird weiter in diese Richtung geforscht.^[21]

Danksagung

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für finanzielle Unterstützung durch SPP1784, CA275 und GFK2062. Wir danken dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) für zusätzliche Unterstützung durch den Exzellenzcluster CiPS^M. Weiterhin bedanken wir uns für die Unterstützung durch die Europäische Union durch das *Marie Curie International Training and Mobility*-Netzwerk „Clickgene“ (grant No. 642023). M.S. dankt dem Fonds der Chemischen Industrie für ein Promotionsstipendium.

Stichwörter: Peptidderivatisierungsreagenz, Sulfoxidpyrolyse, Isobarenmarkierung, Quantitative Massenspektrometrie, komplementäre Ionen-Cluster, Proteomik

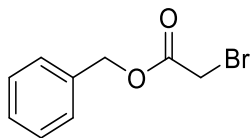
- [1] S. Goodwin, J. D. McPherson, W. R. McCombie, *Nat. Rev. Genet.* **2016**, *17*, 333-351.
- [2] M. Beck, A. Schmidt, J. Malmstroem, M. Claassen, A. Ori, A. Szymborska, F. Herzog, O. Rinner, J. Ellenberg, R. Aebersold, *Mol. Syst. Biol.* **2011**, *7*, 549.
- [3] M.-S. Kim, S. M. Pinto, D. Getnet, R. S. Nirujogi, S. S. Manda, R. Chaerkady, A. K. Madugundu, D. S. Kelkar, R. Isserlin, S. Jain, J. K. Thomas, B. Muthusamy, P. Leal-Rojas, P. Kumar, N. A. Sahasrabudde, L. Balakrishnan, J. Advani, B. George, S. Renuse, L. D. N. Selvan, A. H. Patil, V. Nanjappa, A. Radhakrishnan, S. Prasad, T. Subbannayya, R. Raju, M. Kumar, S. K. Sreenivasamurthy, A. Marimuthu, G. J. Sathe, S. Chavan, K. K. Datta, Y. Subbannayya, A. Sahu, S. D. Yelamanchi, S. Jayaram, P. Rajagopalan, J. Sharma, K. R. Murthy, N. Syed, R. Goel, A. A. Khan, S. Ahmad, G. Dey, K. Mudgal, A. Chatterjee, T.-C. Huang, J. Zhong, X. Wu, P. G. Shaw, D. Freed, M. S. Zahari, K. K. Mukherjee, S. Shankar, A. Mahadevan, H. Lam, C. J. Mitchell, S. K. Shankar, P. Satishchandra, J. T. Schroeder, R. Sirdeshmukh, A. Maitra, S. D. Leach, C. G. Drake, M. K. Halushka, T. S. K. Prasad, R. H. Hruban, C. L. Kerr, G. D. Bader, C. A. Iacobuzio-Donahue, H. Gowda, A. Pandey, *Nature* **2014**, *509*, 575-581.
- [4] N. Nagaraj, J. R. Wisniewski, T. Geiger, J. Cox, M. Kircher, J. Kelso, S. Pääbo, M. Mann, *Mol. Syst. Biol.* **2011**, *7*, 548.
- [5] M. Uhlén, L. Fagerberg, B. M. Hallström, C. Lindskog, P. Oksvold, A. Mardinoglu, Å. Sivertsson, C. Kampf, E. Sjöstedt, A. Asplund, I. Olsson, K. Edlund, E. Lundberg, S. Navani, C. A.-K. Szgyarto, J. Odeberg, D. Djureinovic, J. O. Takanen, S. Hober, T. Alm, P.-H. Edqvist, H. Berling, H. Tegel, J. Mulder, J. Rockberg, P. Nilsson, J. M. Schwenk, M. Hamsten, K. von Feilitzen, M. Forsberg, L. Persson, F. Johansson, M. Zwahlen, G. von Heijne, J. Nielsen, F. Pontén, *Science* **2015**, *347*.
- [6] E. F. Petricoin, K. C. Zoon, E. C. Kohn, J. C. Barrett, L. A. Liotta, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2002**, *1*, 683-695.
- [7] S.-E. Ong, B. Blagoev, I. Kratchmarova, D. B. Kristensen, H. Steen, A. Pandey, M. Mann, *Mol. Cell. Proteomics* **2002**, *1*, 376-386.
- [8] S.-E. Ong, M. Mann, *Nat. Protoc.* **2007**, *1*, 2650-2660.
- [9] J. Cox, M. Y. Hein, C. A. Lubner, I. Paron, N. Nagaraj, M. Mann, *Mol. Cell. Proteomics* **2014**, *13*, 2513-2526.
- [10] A. Thompson, J. Schäfer, K. Kuhn, S. Kienle, J. Schwarz, G. Schmidt, T. Neumann, C. Hamon, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 1895-1904.
- [11] T. Werner, I. Becher, G. Sweetman, C. Doce, M. M. Savitski, M. Bantscheff, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 7188-7194.
- [12] T. Köcher, P. Pichler, M. Schutzbier, C. Stingl, A. Kaul, N. Teucher, G. Hasenfuss, J. M. Penninger, K. Mechtler, *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 4743-4752.
- [13] C. T. Mant, R. S. Hodges, *Methods Enzymol.* **1996**, *271*, 3-50.
- [14] Y. Dunayevskiy, P. Vouros, T. Carell, E. A. Wintner, J. Rebek, *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 2906-2915.
- [15] Y. M. Dunayevskiy, P. Vouros, E. A. Wintner, G. W. Shipps, T. Carell, J. Rebek, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 6152-6157.
- [16] M. Wühr, W. Haas, G. C. McAlister, L. Peshkin, R. Rad, M. W. Kirschner, S. P. Gygi, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 9214-9221.
- [17] S. Y. Ow, M. Salim, J. Noirel, C. Evans, I. Rehman, P. C. Wright, *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 5347-5355.
- [18] N. A. Kulak, G. Pichler, I. Paron, N. Nagaraj, M. Mann, *Nat. Methods* **2014**, *11*, 319-324.
- [19] J. Cox, M. Mann, *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 1367-1372.
- [20] B. K. Erickson, C. M. Rose, C. R. Braun, A. R. Erickson, J. Knott, G. C. McAlister, M. Wühr, J. A. Paulo, R. A. Everley, S. P. Gygi, *Mol. Cell* **2017**, *65*, 361-370.
- [21] Für eine Probe von Reagenz **2** und die selbstentwickelte Software zur Analyse der Daten, besuchen Sie bitte unsere Webseite www.carellgroup.de und kontaktieren Sie uns.

Supporting Information

I. General information

Unless noted otherwise, all reactions were performed using oven-dried glassware under an atmosphere of argon. Molsieve-dried solvents were used from *Sigma Aldrich* and chemicals were bought from *Sigma Aldrich*, *TCI*, *Carbolution*, *Roth* and *Carbosynth*. Formaldehyde-¹³C solution (20wt% in water, 99 atom% ¹³C) and bromoacetic acid-2-¹³C (99 atom% ¹³C) were purchased from *Sigma Aldrich*. HyperSep™ C18 cartridges for desalting were purchased from *ThermoFisher Scientific*. For extraction and chromatography purposes, technical grade solvents were distilled prior to their usage. Reaction controls were performed using TLC-Plates from *Merck* (Merck 60 F²⁵⁴), flash column chromatography purifications were performed on *Merck Geduran Si 60* (40–63 μM). Visualization of the TLC plates was achieved through UV-absorption or through staining with *CAM stain* (Cerium ammonium molybdate stain). NMR spectra were recorded in deuterated solvents on *Varian VXR400S*, *Varian Inova 400*, *Bruker AMX 600*, *Bruker Ascend 400* and *Bruker Avance III HD*. HR-ESI-MS spectra were obtained from a *Thermo Finnigan LTQ FT-ICR*. IR-measurements were performed on a *Perkin Elmer Spectrum BX FT-IR* spectrometer with a diamond-ATR (*Attenuated Total Reflection*) unit.

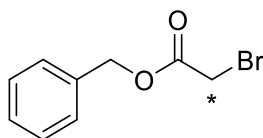
II. Synthesis of starting materials



Benzyl bromoacetate (12)

General procedure 1 (GP1): In a dry and Ar-flushed Schlenk-flask, bromoacetic acid (1.00 g, 7.19 mmol, 1.2 equiv), phenylmethanol (640 μ L, 6.20 mmol, 1.0 equiv) and 4-methylbenzene-1-sulfonic acid (21 mg, 0.12 mmol, 0.02 equiv) were dissolved in 10 mL toluene and refluxed for 2 h. After completion, the reaction mixture was cooled to rt and washed with 20% sodium bicarbonate solution in water (2 x 20 mL) followed by brine (2 x 20 mL) and water (2 x 20 mL). The combined organic layers were dried over magnesium sulfate and concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (silica gel, EtOAc/DCM 1:4) yielded **12** as a colourless oil (1.38 g, 6.02 mmol, 84%).

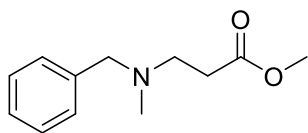
¹H-NMR (400 MHz, methanol-*d*₄) δ = 7.46 – 7.13 (m, 5H), 5.16 (s, 2H), 3.95 (s, 2H) ppm.



Benzyl bromo(2-¹³C)acetate (11)

Following **GP1**, bromoacetic acid-2-¹³C (500 mg, 3.60 mmol, 1.2 equiv) and phenylmethanol (320 μ L, 3.10 mmol, 1.0 equiv) were dissolved in toluene (5 mL). 4-Methylbenzene-1-sulfonic acid (11 mg, 60 μ mol, 0.02 equiv) was added and the reaction mixture was stirred under reflux for 2 h. Work-up was performed as described under **GP1**. Purification by flash column chromatography (silica gel, EtOAc/DCM 1:4) yielded **11** as a colourless oil (427 mg, 1.86 mmol, 52%).

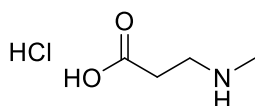
¹H-NMR (400 MHz, methanol-*d*₄) δ = 7.41 – 7.33 (m, 5H), 5.20 (s, 2H), 4.18 (s, 1H), 3.80 (s, 1H) ppm. **HRMS** (EI): calc. for C₈¹³CH₁₀BrO₂⁺ [M]⁺: 229.9820; found: 229.9718 *m/z*. **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3065, 1733, 1587, 1497, 1455, 1376, 1278, 1213, 1147, 1106, 967, 736.



Methyl 3-[benzyl(methyl)amino]propanoate (**13**)

Methyl-3-bromopropanoate (3.00 g, 18.0 mmol, 1.0 equiv) and N-methyl-1-phenylmethanamine (2.18 g, 18.0 mmol, 1.0 equiv) were dissolved in acetonitrile (120 mL). After 2 min stirring at rt, Na₂CO₃ (19.0 g, 180 mmol, 10.0 equiv) was added and the temperature was increased to 70 °C for 24 h. After cooling, the reaction solution was filtered, and DCM (120 mL) was added to the filtrate. The organic phase was washed with 0.5 M NaOH (3 × 50 mL) and dried over Na₂SO₄. After filtration, the product was concentrated under reduced pressure to yield **13** as colourless oil (3.44 g, 16.5 mmol, 92%).^[1]

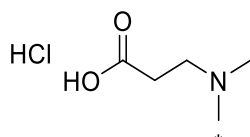
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.30 – 7.18 (m, 5H), 3.63 (s, 3H), 3.48 (s, 2H), 2.71 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.49 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.17 (s, 3H) ppm. **¹³C-NMR** (101 MHz, CDCl₃): δ = 173.0, 138.9, 128.9, 128.2, 127.0, 62.1, 52.6, 51.6, 41.9, 32.8 ppm. **HRMS** (ESI): calc. for C₁₂H₁₈NO₂⁺ [M+H]⁺: 208.1332; found: 208.1331 *m/z*. **IR** (cm⁻¹): ν̄ = 2950 (w), 2841 (w), 2790 (w), 1737 (s), 1495 (w), 1452 (m), 1236 (m), 1357 (w), 1325 (w), 1202 (m), 1168 (s), 1125 (m), 1975 (w), 1038 (m), 1025 (m).



3-(Methylamino)propanoic acid hydrochloride (**14**)

In a flame-dried Schlenk tube methyl 3-[benzyl(methyl)amino]propanoate **13** (1.00 g, 4.82 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in MeOH (60 mL). Then the atmosphere of the tube was purged with N₂ and Pd/C (100 mg, 10wt%) was added in small portions to the solution. The reaction was stirred for 16 h at room temperature in an H₂ atmosphere. Pd/C was filtered off through celite. Evaporation resulted in a yellowish oil. The crude volatile product was used without further purification for the next step. The resulting methyl ester was dissolved in 5 M HCl and refluxed for 8 h. The solution was evaporated to dryness. Recrystallization from MeOH/Et₂O yielded the desired product **14** as colourless hygroscopic crystals (478 mg, 3.42 mmol, 71%).^[1]

Mp.: 89 – 92 °C. **¹H-NMR** (400 MHz, D₂O) δ = 3.28 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.81 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 2.72 (s, 3H) ppm. **¹³C-NMR** (101 MHz, CDCl₃): δ = 174.1, 44.4, 33.0, 29.9 ppm. **HRMS** (ESI): calc. for C₄H₁₀NO₂⁺ [M+H]⁺: 104.0706; found: 104.0706 m/z . **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3376 (w), 2968 (s), 2819 (s), 1729 (s), 1557 (w) 1465 (m), 1402 (s) 1351 (w), 1289 (w), 1189 (s), 1156 (s), 1024 (s).



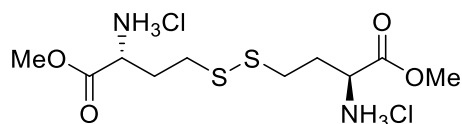
3-{Methyl[(¹³C)methyl]amino}propanoic acid hydrochloride (10)

3-(Methylamino)propanoic acid hydrochloride **14** (401 mg, 2.87 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in 88% formic acid (1.79 mL, 44.8 mmol, 15.6 equiv). Then (¹³C)formaldehyde (20% in water; 1.00 g, 6.45 mmol, 2.3 equiv) was added and the solution was heated *via* microwave irradiation (110 °C, 100 W, 1 h). Conc. HCl (200 μ L) was added and the solvent was removed *in vacuo*. Traces of formic acid were removed azeotropically with toluene *in vacuo*. The slightly yellowish solid was recrystallized from MeOH/Et₂O to obtain a colourless solid (383 mg, 2.48 mmol, 86%).^[2-4]

Mp.: 183 °C. **¹H-NMR** (400 MHz, D₂O): δ = 3.30 (td, J = 6.7, 3.0 Hz, 2H), 2.97 – 2.60 (m, 8H) ppm. **¹³C-NMR** (101 MHz, D₂O): δ = 174.1, 53.1, 43.3, 42.8, 28.8 ppm. **HRMS** (ESI): calc. for C₄¹³CH₁₂NO₂⁺ [M+H]⁺ 119.0896, found 119.0896 m/z . **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 2957(m), 2692 (m), 2592 (w), 2481 (w), 1717 (s), 1468 (w), 1420 (m), 1370 (w), 1300 (w), 1201 (s) 1161 (m), 1006 (w), 966 (m), 854 (s), 798 (m).

III. General experimental procedures

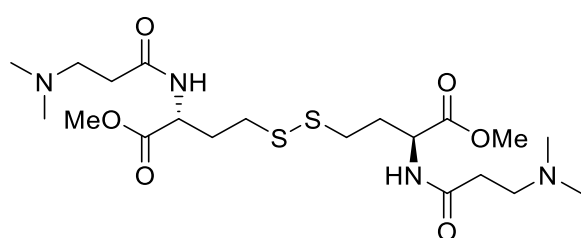
In the following section, molecules towards compound 2¹⁷⁹ will be assigned with ** and molecules towards compound 2¹⁸⁰ will be assigned with *.



Methyl (2R)-2-amino-4-[[[(3S)-3-amino-4-methoxy-4-oxobutyl]disulfanyl]butanoate hydrochloride (3)

In a dry and Ar-flushed 250 mL Schlenk-flask, DL-homocystine (4,4'-disulfanediybis(2-aminobutanoic acid) (6.00 g, 22.3 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in anhydrous MeOH (80 mL). The colourless suspension was cooled to 0 °C and thionyl chlorid (6.48 mL, 89.4 mmol, 4.0 equiv) was added dropwise *via* syringe. The resulting colourless reaction mixture was allowed to warm to rt over 3 h. Then, the reaction mixture was concentrated *in vacuo* yielding **3** as a colourless solid (8.24 g, 22.3 mmol, quant).

¹H-NMR (400 MHz, methanol-*d*₄) δ = 4.21 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.86 (s, 6H), 2.84 (m, 4H), 2.47 – 2.22 (m, 4H) ppm. ¹³C-NMR (400 MHz, methanol-*d*₄) δ = 170.5, 53.9, 52.6, 33.6, 30.9 ppm. HRMS (ESI): calc. for C₁₀H₂₁N₂O₄S₂⁺ [M+H]⁺: 297.0937; found: 297.0938 *m/z*. IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3373, 2854, 2611, 2003, 1738, 1591, 1503, 1439, 1224, 1139, 860.

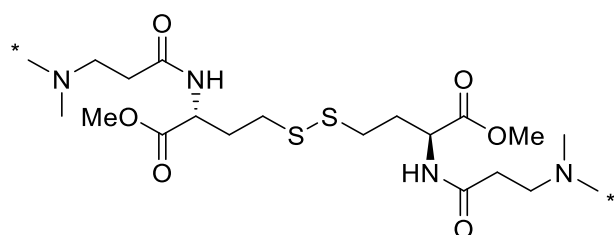


Methyl (2R)-2-[3-(dimethylamino)propanamido]-4-[(3S)-3-[3-(dimethylamino)propanamido]-4-methoxy-4-oxobutyl]disulfanyl]butanoate (4)

General procedure 2 (GP2): In a dry and Ar-flushed Schlenk-flask, 3-(dimethylamino)propanoic acid dihydrochloride (372 mg, 2.42 mmol, 2.4 equiv) and the methyl ester **3** (300 mg, 1.01 mmol, 1.0 equiv) were dissolved in 5 mL anhydrous DMF. Then, triethylamine (491 μ L, 2.12 mmol, 3.5 equiv), HOBt (340 mg, 2.50 mmol, 2.5 equiv) and EDC*HCl (405 mg, 2.61 mmol, 2.6 equiv) were added and stirred for

2 h at 60 °C. The resulting orange suspension was concentrated *in vacuo*. Purification by flash column chromatography (silica gel, DCM/MeOH 16:1) furnished **4** as a colourless solid (426 mg, 861 μmol , 86%).

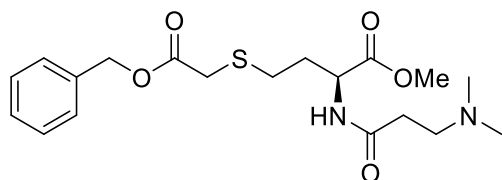
$^1\text{H-NMR}$ (800 MHz, methanol- d_4) δ = 4.62 – 4.55 (m, 2H), 3.75 (d, J = 1.5 Hz, 3H), 3.37 (s, 3H), 2.84 – 2.79 (m, 2H), 2.78 – 2.72 (m, 2H), 2.71 – 2.63 (m, 4H), 2.46 (td, J = 7.3, 2.8 Hz, 4H), 2.30 – 2.04 (m, 16H) *ppm*. **$^{13}\text{C-NMR}$** (201 MHz, methanol- d_4) δ = 174.4, 173.5, 52.9, 52.4, 49.9, 35.6, 35.5, 34.1, 32.1 *ppm*. **HRMS** (ESI): calc. for $\text{C}_{20}\text{H}_{39}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}_2^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 495.2305; found: 495.2303 *m/z*. **IR** (cm^{-1}): $\tilde{\nu}$ = 3382, 2953, 2833, 2498, 2069, 1733, 1643, 1548, 1439, 1222, 1173, 1119, 977, 856.



Dimethyl-4,4'-disulfanediyldi(2*R*,2'*S*)-bis(2-(3-(methyl(methyl- ^{13}C)amino)propanamido)butanoate) (**4****)

Following **GP2** 3-{methyl[^{13}C]methyl]amino}propanoic acid hydrochloride **10** (220 mg, 1.42 mmol, 2.2 equiv) and methyl ester **3** (238 mg, 645 μmol , 1.0 equiv) yielded **4**** as a colourless solid (200 mg, 403 μmol , 62%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ = 4.57 (ddd, J = 8.5, 4.8, 3.1 Hz, 2H), 3.73 (s, 6H), 2.83 – 2.59 (m, 8H), 2.46 – 1.99 (m, 20H). **HRMS** (ESI): calc. for $\text{C}_{18}^{13}\text{C}_2\text{H}_{39}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}_2^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 497.2373; found: 497.2379 *m/z*.



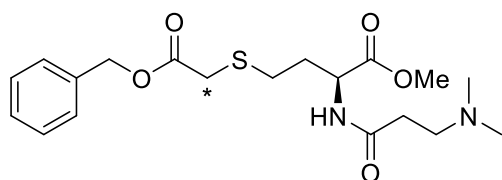
Methyl (2*S*)-4-{[2-(benzyloxy)-2-oxoethyl]sulfanyl}-2-[3-(dimethylamino)propanamido]butanoate (**5**)

General procedure 3 (GP3): Disulfide **4** (750 mg, 1.51 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in a mixture of 5 mL H_2O and 15 mL DMF. Then, NaHCO_3 (535 mg, 6.37 mmol, 4.2 equiv) and TCEP*HCl (435 mg, 1.51 mmol, 1.0 equiv) were added to

the reaction mixture under argon. The reduction was monitored by LC-MS and TLC. After completion of the reduction, benzyl bromoacetate (600 μL , 3.79 mmol, 2.5 equiv) was added and the reaction mixture was stirred for 2 h at rt. The reaction mixture was then concentrated *in vacuo* and purified by flash column chromatography (silica gel, 5% MeOH in DCM) furnishing **5** as a colourless oil (510 mg, 1.29 mmol, 42%).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, methanol- d_4) δ = 7.53 – 7.15 (m, 5H), 5.18 (s, 2H), 4.56 (dd, J = 8.9, 4.8 Hz, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.33 (s, 2H), 2.75 – 2.58 (m, 4H), 2.45 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.29 (s, 6H), 2.17 – 2.05 (m, 1H), 2.02 – 1.90 (m, 1H) *ppm*.

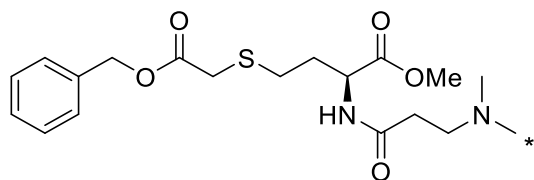
$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ = 172.6, 172.5, 170.2, 135.6, 128.7, 128.5, 128.4, 67.2, 55.1, 52.5, 51.1, 44.6, 33.5, 32.8, 31.8, 28.5 *ppm*. **HRMS** (ESI): calc. for $\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 397.1791; found: 397.1791 *m/z*. **IR** (cm^{-1}): $\tilde{\nu}$ = 3285, 2950, 2864, 1736, 1655, 1539, 1455, 1440, 1374, 1271, 1213, 1170, 1146, 1025, 748, 698.



Methyl (2S)-4-([2-(benzyloxy)-2-oxo(1- ^{13}C)ethyl]sulfanyl)-2-[3-(dimethylamino)propanamido]butanoate (5*)

Following **GP3**, the disulfide **4** (370 mg, 750 μmol , 1.0 equiv) and benzyl bromo(2- ^{13}C)acetate **11** (294 μL , 1.86 mmol, 2.3 equiv) gave **5*** as a colourless oil (550 mg, 1.38 mmol, 92%).

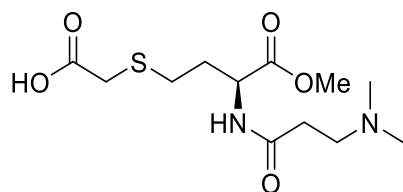
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, methanol- d_4) δ = 7.42 – 7.28 (m, 5H), 5.16 (s, 2H), 4.59 – 4.52 (m, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.50 (s, 1H), 3.15 (s, 1H), 2.93 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.75 – 2.60 (m, 2H), 2.56 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.50 (s, 6H), 2.19 – 2.05 (m, 1H), 2.04 – 1.86 (m, 1H) *ppm*. **HRMS** (ESI): calc. for $\text{C}_{18}^{13}\text{CH}_{29}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 398.1825; found: 398.1824 *m/z*.



Methyl (2S)-4-[[2-(benzyloxy)-2-oxoethyl]sulfanyl]-2-(3-{methyl[(¹³C)methyl]amino}propanamido)butanoate (5^{})**

Following **GP3**, the disulfide **4^{**}** (200 mg, 400 μ mol, 1.0 equiv) furnished **5^{**}** as a colourless oil (252 mg, 634 μ mol, 79%).

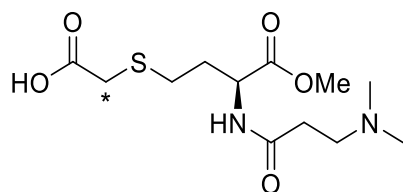
¹H-NMR (400 MHz, methanol-*d*₄): δ = 7.40 – 7.28 (m, 5H), 5.15 (s, 2H), 4.53 (dd, *J* = 8.93, 4.90 Hz, 1H), 3.69 (s, 3H), 3.32 (s, 2H), 2.73 – 2.56 (m, 4H), 2.44 – 1.87 (m, 10H) *ppm*. **¹³C-NMR** (101 MHz, methanol-*d*₄) δ = 174.5, 173.6, 172.0, 137.3, 129.6, 129.3, 129.3, 67.9, 56.0, 52.8, 52.6, 45.1, 34.2, 34.0, 32.0, 29.5 *ppm*. **HRMS** (ESI): calc. for C₁₈¹³CH₂₉N₂O₅S⁺ [M+H]⁺: 398.1825; found: 398.1826 *m/z*.



((3S)-3-[3-(Dimethylamino)propanamido]-4-methoxy-4-oxobutyl)sulfanyl)acetic acid (6)

General procedure 4 (GP4): In a dry and Ar-flushed Schlenk-flask, the benzyl-protected sulfide **5** (160 mg, 400 μ mol, 1.0 equiv) was dissolved in 3 – 4 mL of 10 % formic acid in methanol. Then, palladium black (160 mg, 100wt%) was added to the reaction mixture and stirred for 2 h at 40 °C. The deprotection was monitored by LC-MS and TLCs. After completion, the reaction mixture was filtered, concentrated *in vacuo* and purified by flash column chromatography (silica gel, 25 % MeOH in DCM) furnishing **6** as a colourless oil (100 mg, 326 μ mol, 81%).

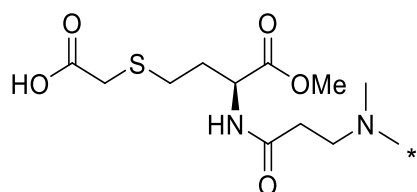
¹H-NMR (400 MHz, methanol-*d*₄) δ = 4.61 (dd, *J* = 9.4, 4.2 Hz, 1H), 3.27 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H), 3.21 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H), 3.12 (s, 2H), 2.75 (s, 6H), 2.73 – 2.55 (m, 4H), 2.18 – 2.07 (m, 1H), 2.05 – 1.93 (m, 1H) *ppm*. **LRMS** (ESI⁺): calc. for C₁₂H₂₃N₂O₅S⁺ [M+H]⁺: 307.1322; found: 307.10 *m/z*. **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3253, 1734, 1652, 1574, 1468, 1372, 1217, 1147, 1084, 977, 761.



{{(3S)-3-[3-(Dimethylamino)propanamido]-4-methoxy-4-oxobutyl)sulfanyl}(2-¹³C)acetic acid (6*)

Following **GP4**: **5*** (580 mg, 1.46 mmol, 1.0 equiv) gave **6*** as a colourless oil (280 mg, 911 μ mol, 62%).

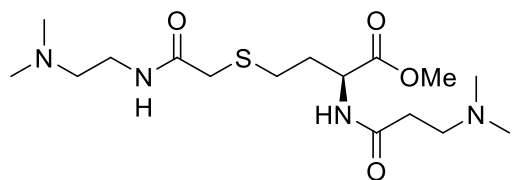
¹H-NMR (400 MHz, methanol-*d*₄) δ = 4.62 (dd, *J* = 9.4, 4.2 Hz, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.35 (s, 2H), 3.30 – 3.24 (m, 2H), 3.17 (dq, *J* = 13.0, 6.4 Hz, 1H), 2.74 (s, 6H), 2.72 – 2.60 (m, 4H), 2.18 – 1.94 (m, 2H) *ppm*. **¹³C-NMR** (101 MHz, methanol-*d*₄) δ = 173.9, 172.4, 170.2, 55.2, 52.8, 49.8, 44.0, 37.3, 31.8, 31.6, 29.2 *ppm*. **HRMS** (ESI): calc. for C₁₁¹³CH₂₃N₂O₅S⁺ [M+H]⁺: 308.1356; found: 308.1356 *m/z*.



{[(3S)-4-Methoxy-3-(3-{methyl[(¹³C)methyl]amino}propanamido)-4-oxobutyl)sulfanyl]acetic acid (6)}**

Following **GP4**: **5**** (252 mg, 630 μ mol, 1.0 equiv) furnished **6**** as a colourless oil (181 mg, 589 μ mol, 93%).

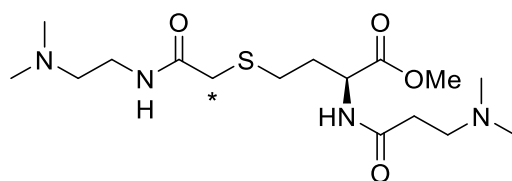
¹H-NMR (400 MHz, methanol-*d*₄): δ = 4.61 (dd, *J* = 9.5, 4.2 Hz, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.38 – 3.16 (m, 4H), 3.08 (d, *J* = 3.26 Hz, 2H), 2.94 – 2.59 (s, 10H) *ppm*. **HRMS** (ESI): calc. for C₁₁¹³CH₂₃N₂O₅S⁺ [M+H]⁺: 308.1356; found 308.1357 *m/z*.



Methyl (2S)-4-[(2-[[2-(dimethylamino)ethyl]amino]-2-oxoethyl)sulfanyl]-2-[3-(dimethylamino)propanamido]butanoate (7)

Genral procedure 5 (GP5): The acid **6** (100 mg, 330 μmol , 1.0 equiv) was placed in a dry and Ar-flushed 50 mL Schlenk-flask and dissolved in 10 mL of dry DMF. Then *N*¹,*N*²-dimethylethane-1,2-diamine (42.0 μL , 390 μmol , 1.2 equiv), diisopropylethylamine (83.0 μL , 490 μmol , 1.5 equiv) and PyBOP (203 mg, 39.0 μmol , 1.2 equiv) were added and the reaction mixture was stirred at rt for 1 h. The reaction mixture was concentrated *in vacuo* and purified by flash column chromatography (silica gel, 1:12 MeOH/DCM) furnishing **7** as a colourless oil (90.0 mg, 239 μmol , 73%).

¹H-NMR (400 MHz, methanol-*d*₄) δ = 4.56 (dd, *J* = 9.0, 4.8 Hz, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.38 – 3.32 (m, 2H), 3.19 (d, *J* = 1.3 Hz, 2H), 2.74 – 2.57 (m, 4H), 2.47 (dt, *J* = 11.6, 6.8, 4H), 2.30 (d, *J* = 4.3 Hz, 12H), 2.12 (dddd, *J* = 13.2, 8.3, 7.2, 4.9 Hz, 1H), 2.03 – 1.92 (m, 1H) *ppm*. **¹³C-NMR** (101 MHz, methanol-*d*₄) δ = 174.4, 173.6, 172.5, 59.0, 56.0, 52.8, 52.6, 45.4, 45.0, 38.2, 36.0, 34.0, 32.1, 29.7 *ppm*. **LRMS (ESI⁺):** calc. for C₁₆H₃₃N₄O₄S⁺ [M+H]⁺: 377.2217; found: 377.19 *m/z*. **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3375, 2878, 17740, 1597, 1509, 1439, 1226, 1144, 1066, 1022, 903, 843, 744.

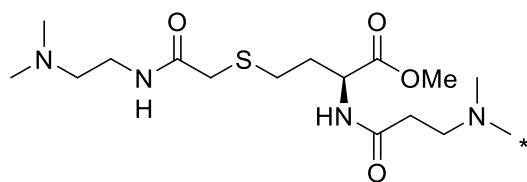


Methyl (2S)-4-[[2-[[2-(dimethylamino)ethyl]amino]-2-oxo(1-¹³C)ethyl]sulfanyl]-2-[3-(dimethylamino)propanamido]butanoate (7*)

Following **GP5**, **6*** (270 mg, 870 μmol , 1.0 equiv) furnished **7*** as a colourless oil (246 mg, 652 μmol , 74%).

¹H-NMR (400 MHz, methanol-*d*₄) δ = 4.56 (dd, *J* = 9.0, 4.8 Hz, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.36 – 3.33 (m, 4H), 2.74 – 2.58 (m, 4H), 2.47 (dt, *J* = 11.4, 7.0 Hz, 4H), 2.30 (d, *J* = 4.1 Hz,

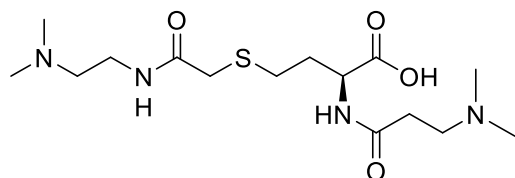
12H), 2.18 – 1.92 (m, 1H), 1.29 – 1.15 (m, 1H) ppm. **LRMS (ESI⁺)**: calc. for C₁₅¹³CH₃₃N₄O₄S⁺ [M+H]⁺: 378.2251; found: 378.24 m/z.



Methyl (2S)-4-[(2-[[2-(dimethylamino)ethyl]amino]-2-oxoethyl)sulfanyl]-2-(3-{methyl[(¹³C)methyl]amino}propanamido)butanoate (7^{})**

Following **GP5**, **6^{**}** (181 mg, 590 μmol, 1.0 equiv) furnished **7^{**}** as a colourless oil (173 mg, 458 μmol, 78%).

¹H-NMR (400 MHz, methanol-*d*₄): δ = 4.46 (dd, *J* = 9.0, 4.8 Hz, 1H), 3.62 (s, 3H), 3.25 (t, *J* = 6.95 Hz, 2H), 3.09 (s, 2H), 2.66 – 2.48 (m, 4H), 2.44 – 1.80 (m, 18H) ppm. **¹³C-NMR** (101 MHz, methanol-*d*₄): δ = 172.9, 172.3, 171.1, 57.6, 54.6, 51.5, 51.3, 44.0, 43.6, 36.8, 34.6, 34.2, 32.5, 30.7, 28.3 ppm. **HRMS (ESI)**: calc. for C₁₅¹³CH₃₃N₄O₄S⁺ [M+H]⁺: 378.2251; found 378.2252 m/z.

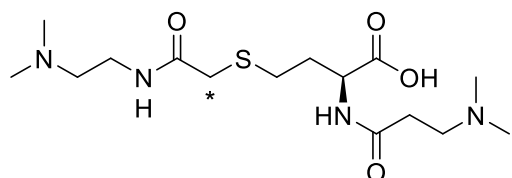


(2S)-4-[(2-[[2-(Dimethylamino)ethyl]amino]-2-oxoethyl)sulfanyl]-2-[3-(dimethylamino)propanamido]butanoic acid (8)

General procedure 6 (GP6): The methylester **7** (90.0 mg, 240 μmol, 1.0 equiv) was dissolved in a mixture of 2 mL H₂O and 5 mL MeOH. Then LiOH (17.0 mg, 710 μmol, 3.0 equiv) was added and the reaction mixture was stirred at rt for 1 h. The product was concentrated under reduced pressure and then desalted with HyperSep™ C18 cartridges (equilibrate: 15 mL acetonitrile and 10 mL H₂O; load: 25 mg in 0.3 mL water; wash: 0.5 mL water; elute: 6 mL 4:1 acetonitrile/water). Lyophilization furnished **8** as a colourless solid (87 mg, 240 μmol, quant.).

¹H-NMR (400 MHz, methanol-*d*₄) δ = 4.55 (dd, *J* = 9.3, 4.5 Hz, 1H), 3.64 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 3.46 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 3.35 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.95 (d, *J* = 13.2 Hz, 12H), 2.90 – 2.83 (m, 2H), 2.81 – 2.64 (m, 2H), 2.22 – 2.11 (m, 1H), 2.09 – 1.97 (m,

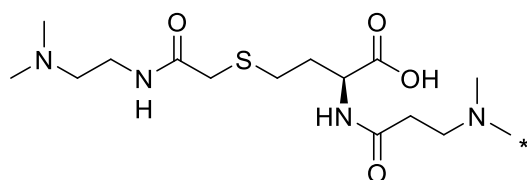
1H) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, methanol- d_4) δ = 174.8, 173.7, 171.9, 58.0, 54.9, 52.7, 43.9, 43.7, 36.2, 36.0, 32.1, 30.8, 30.1 ppm. **HRMS** (ESI): calc. for $\text{C}_{15}\text{H}_{29}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}^-$ [M-H] $^-$: 361.1915; found: 361.1919 m/z . **IR** (cm^{-1}): $\tilde{\nu}$ = 3368, 2916, 1743, 1632, 1524, 1439, 1311, 1227, 1160, 1059, 984, 845.



(2S)-4-[[2-[[2-(Dimethylamino)ethyl]amino]-2-oxo(1- ^{13}C)ethyl]sulfanyl]-2-[3-(dimethylamino)propanamido]butanoic acid (8*)

Following **GP6**: **7*** (220 mg, 580 μmol , 1.0 equiv) furnished **8*** as a colourless solid (110 mg, 289 μmol , 74%).

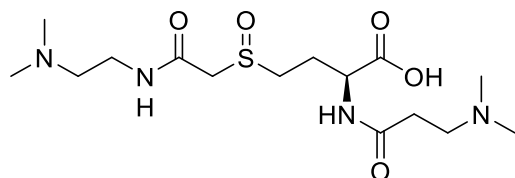
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, methanol- d_4) δ = 4.33 (dd, J = 7.8, 4.6 Hz, 1H), 3.39 – 3.02 (m, 4H), 2.67 – 2.56 (m, 4H), 2.45 (dt, J = 14.7, 7.1 Hz, 4H), 2.27 (d, J = 3.2, 12H), 2.18 – 1.87 (m, 2H) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, methanol- d_4) δ = 176.8, 172.3, 172.3, 57.6, 54.8, 54.2, 44.1, 43.7, 37.0, 36.9, 33.2, 32.7, 28.6 ppm. **HRMS** (ESI): calc. for $\text{C}_{14}^{13}\text{CH}_{29}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}^-$ [M-H] $^-$: 362.1949; found: 362.1952 m/z .



(2S)-4-[[2-[[2-(Dimethylamino)ethyl]amino]-2-oxoethyl]sulfanyl]-2-(3-{methyl[(^{13}C)methyl]amino}propanamido)butanoic acid (8)**

Following **GP6**: **7**** (173 mg, 0.460 mmol, 1.0 equiv) furnished **8**** as a colourless solid (105 mg, 289 μmol , 62%).

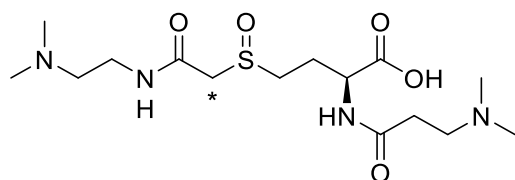
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, methanol- d_4): δ = 4.33 (dd, J = 7.8, 4.6 Hz, 1H), 3.35 (t, J = 6.41 Hz, 2H), 3.19 (s, 2H), 2.67 – 2.56 (m, 4H), 2.50 – 1.88 (m, 18H). **HRMS** (ESI): calc. for $\text{C}_{14}^{13}\text{CH}_{31}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}^+$ [M+H] $^+$: 364.2094; found: 364.2096 m/z .



(2S)-4-(2-([2-(Dimethylamino)ethyl]amino)-2-oxoethanesulfinyl)-2-[3-(dimethylamino)propanamido]-butanoic acid (9)

General procedure 7 (GP7): **8** (50 mg, 140 μ mol, 1.0 equiv) was dissolved in 2 mL dest. H₂O. After the pH value was set to pH = 2 (HCl, 2M), mCPBA (31 mg, 140 μ mol, 1.0 equiv) was added and the reaction mixture was stirred at rt for 20 min. The oxidation was monitored by LC-MS. After completion, residual mCPBA was removed by extraction with DCM (4 x 10 mL). Lyophilization of the aqueous phase gave **9** as a colourless solid (40 mg, 0.11 mmol, 75%).

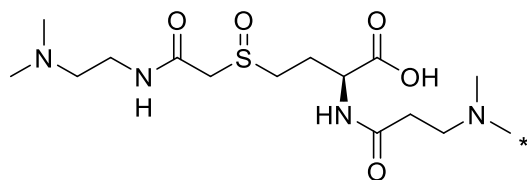
¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ = 4.46 (td, J = 8.1, 5.1, 1H), 3.90 – 3.72 (m, 2H), 3.6 – 3.51 (m, 2H), 3.34 (td, J = 6.7, 1.8 Hz, 2H), 3.25 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 3.06 – 2.85 (m, 2H), 2.82 (d, J = 9.5 Hz, 12H), 2.76 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.34 – 2.19 (m, 1H), 2.17 – 2.04 (m, 1H) *ppm*. **¹³C-NMR** (101 MHz, D₂O) δ = 174.4, 171.7, 166.9, 56.2, 56.0, 55.9, 53.3, 47.3, 47.2, 42.9, 42.8, 34.9, 29.5, 24.0 *ppm*. **HRMS** (ESI): calc. for C₁₅H₃₁N₄O₅S⁺ [M+H]⁺: 379.2010; found: 379.2012 *m/z*.



(2S)-4-[2-([2-(Dimethylamino)ethyl]amino)-2-oxo(1-¹³C)ethanesulfinyl]-2-[3-(dimethylamino)propanamido]-butanoic acid (9*)

Following **GP7**: **8*** (145 mg, 390 μ mol, 1.0 equiv) furnished **9*** as a colourless solid (104 mg, 273 μ mol, 70%).

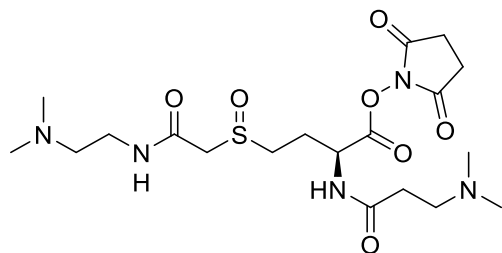
¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ = 4.46 (ddt, J = 15.6, 10.1, 5.0 Hz, 1H), 4.10 – 3.50 (m, 4H), 3.35 (dt, J = 8.0, 4.0 Hz, 2H), 3.24 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 3.07 – 2.95 (m, 2H), 2.82 (d, J = 9.4 Hz, 12H), 2.75 (q, J = 6.7 Hz, 2H), 2.29 (dp, J = 13.5, 7.4 Hz, 1H), 2.19 – 2.00 (m, 1H) *ppm*. **HRMS** (ESI): calc. for C₁₄¹³CH₃₁N₄O₅S⁺ [M+H]⁺: 380.2043 found: 380.2045 *m/z*.



(2S)-4-(2-[[2-(Dimethylamino)ethyl]amino]-2-oxoethanesulfinyl)-2-(3-{methyl[(¹³C)methyl]amino}propanamido)butanoic acid (9^{})**

Following **GP7**: **8^{**}** (105 mg, 290 μ mol, 1.0 equiv) furnished **9^{**}** as a colourless solid (75 mg, 198 μ mol, 69%).

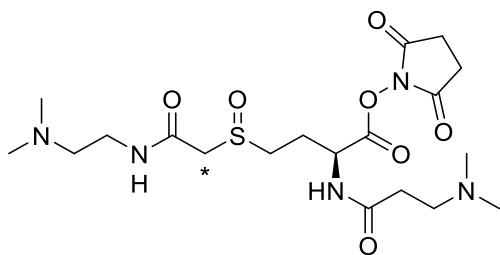
¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ = 4.52 (dd, J = 8.7, 5.1 Hz, 1H), 3.71 – 3.29 (m, 8H), 3.10 – 2.62 (m, 16H), 2.50 – 2.17 (m, 2H) ppm. **HRMS** (ESI): calc. for C₁₄¹³CH₃₁N₄O₅S⁺ [M+H]⁺: 380.2043; found: 380.2042 m/z .



2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl (2S)-4-[[2-[[2-(dimethylamino)ethyl]amino]-2-oxoethyl)sulfanyl]-2-[3-(dimethylamino)propanamido]butanoate (2)

General procedure 8 (GP8): Sulfoxide **9** (80 mg, 211 μ mol, 1.0 equiv) was dissolved in 5 mL DMF. Then, dry pyridine (33 μ g, 422 μ mol, 2.0 equiv) and NHS-TFA (89 mg, 422 μ mol, 2.0 equiv) were added to the reaction mixture. The reaction was monitored by LC-MS. After completion, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The resulting orange oil was dissolved in acetonitrile and precipitated with cold acetone yielding **2** as a colourless solid (35 mg, 73.4 μ mol, 35%).

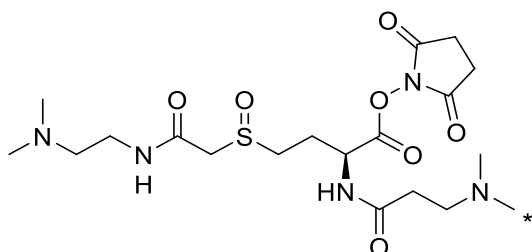
HRMS (ESI): calc. for C₁₈¹³CH₃₄N₅O₇S⁺ [M+H]⁺: 476.2174; found: 476.2173 m/z



2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl (2S)-4-{[2-([2-(dimethylamino)ethyl]amino)-2-oxo(1-¹³C)ethyl]sulfanyl}-2-[3-(dimethylamino)propanamido]butanoate (2*)

Following **GP8: 9*** (50 mg, 132 μ mol, 1.0 equiv) furnished **2*** as a colourless solid (20 mg, 42 μ mol, 32%).

HRMS (ESI): calc. for $C_{18}^{13}CH_{34}N_5O_7S^+$ $[M+H]^+$: 477.2207; found: 477.2212 *m/z*.



2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl (2S)-4-[(2-([2-(dimethylamino)ethyl]amino)-2-oxoethyl)sulfanyl]-2-(3-{methyl[(¹³C)methyl]amino}propanamido)butanoate (2)**

Following **GP8: 9**** (75 mg, 198 μ mol, 1.0 equiv) furnished **2**** as a colourless solid (30 mg, 63 μ mol, 32%).

HRMS (ESI): calc. for $C_{18}^{13}CH_{34}N_5O_7S^+$ $[M+H]^+$: 477.2207; found: 477.2206 *m/z*.

IV. Mass spectrometric analysis

IV. Mass spectrometric analysis

Sample Preparation:

For the MS-experiments, *HEK293T* (ATCC-CRL-3216) lysate was used. After determining the protein content *via* Bradford-Assay, 150 µg of the lysate were solved in 200 µL digest-buffer (50 mM TEAB pH = 8.5, 1 mM MgCl₂), the disulfide bonds of proteins were reduced with DTT (final concentration 20 mM, 60 °C, 1 h) and cysteines were alkylated using iodacetamide (final concentration 40 mM, room temperature, 30 min, dark). After adjusting the pH of the samples to 7-8 using 1 mM TEAB, 3 µg Trypsin (MS-grade, *Pierce, Thermo Fisher Scientific*) in 6 µL 50 mM AcOH was added and the sample was digested for 2 h at 55 °C. Afterwards, the peptides were desalted and concentrated using Stage-Tips.^[5]

40 µg of lyophilized lysate was solved in 40 µL of TEAB-buffer (150 mM, pH = 8.5). Four portions of 8.5 µL (8.50 µg protein content) each were divided and labelled with TMT-126, TMT-127, SOT-179 and SOT-180, respectively.

For TMT-labelling, the instructions provided by the manufacturer were used (*Thermo Fisher Scientific*). In case of the SOT-reagents, a solution of SOT-179 and SOT-180 in dry DMSO with a concentration of 0.1 mg/µL was used for the labelling. The peptide mixture was diluted with 31.5 µL of TEAB-buffer (150 mM, pH = 8.5) and 1.5 mg of SOT-179 or SOT-180, respectively, in 15 µL DMSO was added. The samples were incubated for 1 h at room temperature. To quench residual reagent activity, 5 µL of a hydroxylamine-solution (5%) was added to each sample (15 min, rt).

The labelled lysates were combined in a 1 to 1 ratio, diluted with 1% TFA_(aq) until an acidic pH was measured and then purified by Stage-Tips. For both the TMT- and the SOT-duplexes, the complete sample consisted of 1.1 µg of lysate protein content. Per measurement, in total 1 µg of lysate was injected for analysis.

To investigate the ratio distortion effect, Trypsin-digested BSA MS Standard (*NEB*) was also labelled with TMT or SOT according to the procedure above. HEK-lysates were labelled as described above for SOT and TMT and combined to give a human

peptide background in a labelled ratio of 1 to 1. Into this background, the labelled BSA was added in a ratio of 4 to 1. The peptides were purified by Stage-Tips. Per measurement a total of 1 µg labelled *HEK*-background lysate and 0.15 pmol of labelled BSA-peptides were injected for analysis to acquire data which show a high ratio distortion effect.

Mass Spectrometric analysis:

The samples were analyzed with an UltiMate 3000 RSLCnano liquid chromatography system (*Dionex, Thermo Fisher Scientific*) attached to a Q Exactive HF mass spectrometer (*Thermo Fisher Scientific*). They were concentrated on a µ-precolumn cartridge (PepMap100, C₁₈, 5 µM, 100 Å, size 300 µm i.d. x 5 mm (*Dionex, Thermo Fisher Scientific*)) and further processed on a in house packed analytical column (ReproSil-Pur 120 C18-AQ, C₁₈, 1.9 µM, 120 Å (*Dr. A Maisch GmbH*), packed into a 75 µm i.d. x 150 mm fused silica picotip emitter with an 8 µm tip (*New Objective*).

The samples were processed *via* a 120 min multi-step analytical separation at a flow rate of 300 nL/min and a column temperature of 30 °C. Only LC-MS grade solvents were used (solvent A: water + 0.1% formic acid; solvent B: acetonitrile + 0.1% formic acid). The gradient with percentages of solvent B was programmed in the following way:

1% for 3.5 minutes; from 1% to 8% in 1.5 minutes; from 8% to 32% in 95 minutes; from 32% to 60% in 5 minutes; from 60% to 85% in 5 minutes; 85% for 2 minutes; from 85% to 1% in 3 minutes; 1% for 5 minutes.

Mass spectrometric analysis of the *HEK*-lysates was done with a full mass scan in the mass range between m/z 300 and 1750 at a resolution of 120k, an AGC target of 3e6 charges and a maximum ion injection time of 20 ms in profile mode. Following this survey scan, the 15 most intense ions were selected, fragmented and measured in profile mode with the following parameters: resolution of 30000; AGC target of 1e5 charges; maximum ion injection time of 100 ms; isolation window of 1.4 m/z; fixed first mass of 115 m/z; normalized HCD energy of 28%. Signals with an unrecognized charge state or a charge state of 1, 7, 8 or higher weren't picked for fragmentation. To reduce supersampling of the peptides, signals were excluded from the analysis for 20 s after being selected for isolation and fragmentation. The peptide match setting was set to "-" and the exclude isotope setting was set to "on".

In case of the distorted BSA-*spike-in* samples, the same gradient was chosen, but the normalized HCD-energy was set to 30%. All other acquisition parameters remained unchanged.

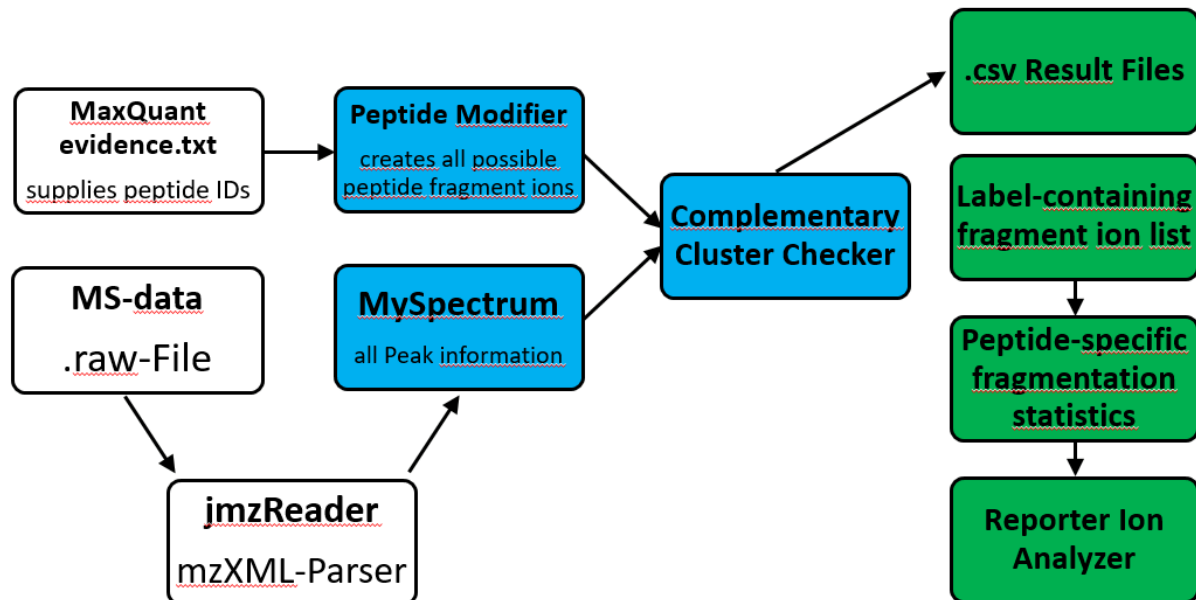
Data Analysis:

Protein and peptide identification was done using the MaxQuant software version 1.6.0.16.^[6] A reporter ion MS2-analysis was chosen. As isobaric label modifications, either the supplied TMT-labels or the SOT-reagents designed by this study were chosen. The intact modification mass of the isobaric SOTs is 361.18648 Da and modification can occur on the peptide N-terminus and lysine residues. For the reporter ion masses, 178.07760 Da for SOT-179 and 179.08095 Da for SOT-180 was set as the neutral mass. Reporter mass tolerance was set to 0.003 Da. Trypsin was set as the used protease and up to two missed cleavages were allowed. Carbamidomethylation was set as static modification on cysteine residues. Oxidation of methionines was set as variable modification. In the first search, 20 ppm and in the main search, 4.5 ppm peptide mass deviation was allowed. As database, a .FASTA-file from Uniprot of *homo sapiens* (Uniprot Proteome ID: UP000005640) downloaded on the 29.08.2017 was used. For analysis of the BSA *spike-in* samples, a different .FASTA was used in which the bovine serum albumin (Uniprot: P02769) sequence was inserted at the beginning. Minimum peptide length was set to 7. PSM and protein FDRs were set to 0.01. For the BSA *spike-in* samples only, the often included search for common contaminants was omitted, since BSA is also contained in this contaminants .FASTA-file.

For further analysis of the acquired data, RawMeat V2.0 build1007 (*VAST Scientific*) was utilized to determine the precursor charge state distribution. If necessary, the .raw file format was converted to .mzXML using the Proteom Wizard MSConvert application. The Peak picking was set to use the vendors peak picking algorithm, centroiding the peaks from MS1 and MS2-scans.

To gain further insight into the fragmentation behavior of the new designed reagent, a novel software pipeline was created. The Java 1.8 code consists of tools to automatically calculate the different m/z-values associated with modified and unmodified peptide fragment ions, determine their sum formula, comparing the peaks from measured spectra to the calculated data and to give out tables identifying the

detected fragments. A schematic representation of the workflow is shown in **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** The software is freely available. For the software package and instructions how it is used, contact the authors of the paper.



Supplementary Figure 1: Automated Data analysis pipeline.

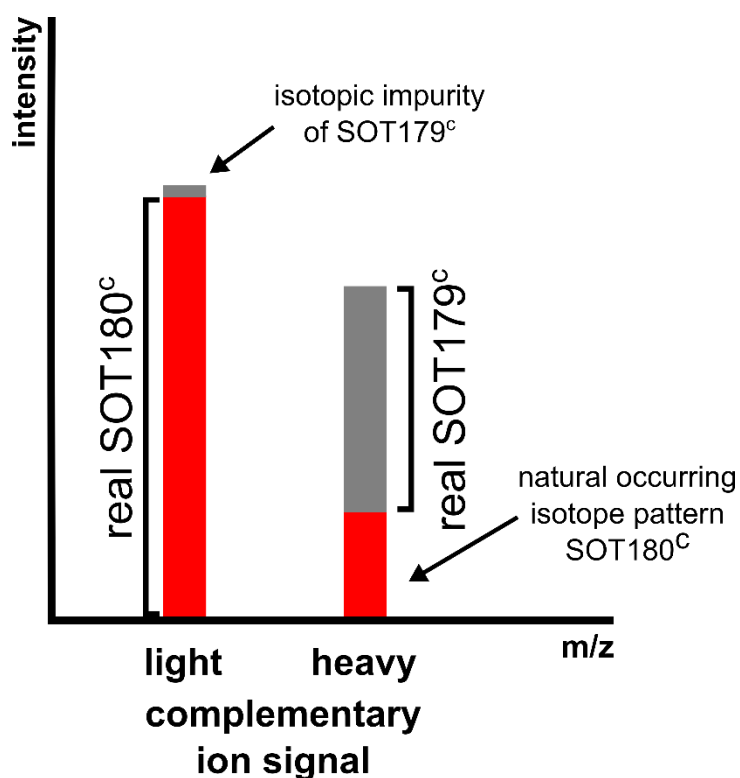
To achieve this, .raw-Files containing the complete MS-data were first converted to .mzXML-files as described above. Next, the *mzXML-parser* node from the Java MS-data parser library *j mzReader* (Griss *et al.*) was utilized to read the generated .mzXML-files and to obtain the peak properties of interest (*m/z*-value, intensity).^[7] Peptide identifications were then read from the “*evidence.txt*”-file generated by MaxQuant. Specifically, the peptide sequence, modifications on the precursor and the scan number were read from the MaxQuant evidence-file. Subsequently, the code generates the respective peptide and the corresponding *b*- and *y*-ions for the charge states $z = 1$ and $z = 2$, which are modified with the different combinations of intact label and the cleaved fragments forming the complementary ions. At the same time, the peak information of the MS²-scan responsible for the identification is extracted by the *mzXML-parser* and an additional module. Next, for each possible modified *b*- and *y*-ion containing the intact or cleaved reagent, the respective spectrum is checked for the corresponding peak. To ensure the stringency of the mass comparison, only 5 ppm of mass deviation are allowed. Finally, hits are stored and given out at the end of the analysis as a .csv-file, where the hits can be sorted whether they contain cleaved or intact labels as modifications.

To even further analyze the data, another node takes all the matched fragments from the first result file and summarizes the fragment numbers for each individual peptide species. In addition, information about the reporter ion intensities can be read out from the MS-files to obtain the median reporter ion intensities.

Ratio calculation:

Although the quantification approach using the complementary ion clusters benefits from a huge reduction of ratio distortion effects and therefore improves the quantification accuracy significantly, the MS-signals must be processed further to give the relative ratios of the samples. Unlike in the reporter ion quantification approach, in which the (possible distorted) ratios can be readout directly from the reporter ion intensities after application of fixed isotopic purity correction factors, this is not the case when analyzing complementary ion clusters. Here, the naturally occurring isotope distribution prohibits the direct determination of the mixing ratios, because the isotope pattern of the light complementary ion and the signal arising from the heavier complementary ion overlap. Since the isotope pattern is not only dependent on the balancer-part of the complementary ion, but also on the residual peptide fragment composition, the influence of the isotope pattern must be calculated for every complementary ion cluster analyzed.

Hence, to approximatively determine the ratio between the light and heavy complementary ions, the abundance of the isotopic signal containing one additional neutron in relation to the monoisotopic signal of the light complementary ion must be calculated. Afterwards, this intensity must be subtracted from the heavy complementary ion signal to remove the isotope pattern interference (with the approximation that the isotope patterns of the light and heavy complementary ions are roughly the same). In addition, the balancer part of the heavy complementary ion SOT179^c contains a ¹³C-atom as a heavy stable isotope marker. Since the commercial available ¹³C-formaldehyde utilized during the synthesis of SOT179 contains also traces of ¹²C-formaldehyde, this isotopic impurity leads to an increase in the light complementary ion signal. Fortunately, this isotopic impurity is very small (<0.4%) and can be determined by mass spectrometric analysis of the SOT179-balancer part. In Supplementary Figure , the contributions of the isotope pattern and the isotopic impurity towards the light and heavy complementary ion signals is visualized.



Supplementary Figure 2: Contributions towards the light and heavy complementary ion signal. While the natural occurring isotope pattern of SOT180^c leads to an increase in the heavy complementary ion signal, the isotopic impurities present in the balancer part of SOT179^c increase the light complementary ion signal.

For the calculation of the relative ratios, the isotopic impurity factor x is measured as the ratio of SOT179^c-signal intensity containing only ¹²C-atoms divided by the SOT179^c signal intensity in which the desired ¹³C-atom was incorporated (Eq. 1).

$$x = \frac{I(SOT179^c(^{12}C))}{I(SOT179^c(^{13}C))} \quad (1)$$

Additionally, the isotope pattern factor λ is calculated from the sum formula of the light complementary ion, which is composed of the balancer and the identified peptide fragment part. The factor determines the relative intensity of the first isotopic signal (monoisotopic signal + one additional neutron n) in relation to the monoisotopic signal of SOT180^c (Eq. 2). It takes into account the natural abundances of heavy isotopes reported from the “Comission on Isotopic Abundances and Atomic Weights” of the IUPAC.^[8]

$$\lambda = \frac{I(SOT180^c(n+1))}{I(SOT180^c(n))} \quad (2)$$

Together with those parameters as well as the measured intensities of the light (I_l) and heavy (I_h) complementary ion signals, one can calculate the real intensities of the complementary ions $I(SOT180^c_{real})$ and $I(SOT179^c_{real})$ (Eqs. 3 and 4).

$$I_{SOT180^c_{real}} = I_l - (x \cdot I_{SOT179^c_{real}}) \quad (3)$$

$$I_{SOT179^c_{real}} = I_h - (\lambda \cdot I_{SOT180^c_{real}}) \quad (4)$$

By combining equations (3) and (4), the following equations arise to calculate the deconvoluted intensities of the complementary ion cluster (Eqs. 5 and 6).

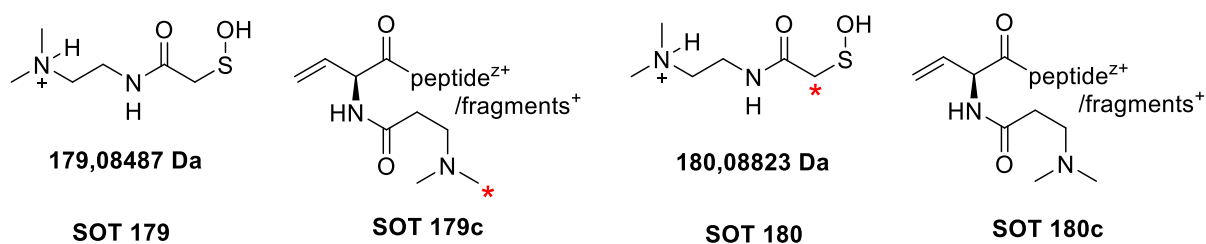
$$I_{SOT180^c_{real}} = \frac{I_l - x \cdot I_h}{1 - x \cdot \lambda} \quad (5)$$

$$I_{SOT179^c_{real}} = \frac{I_h - \lambda \cdot I_l}{1 - x \cdot \lambda} \quad (6)$$

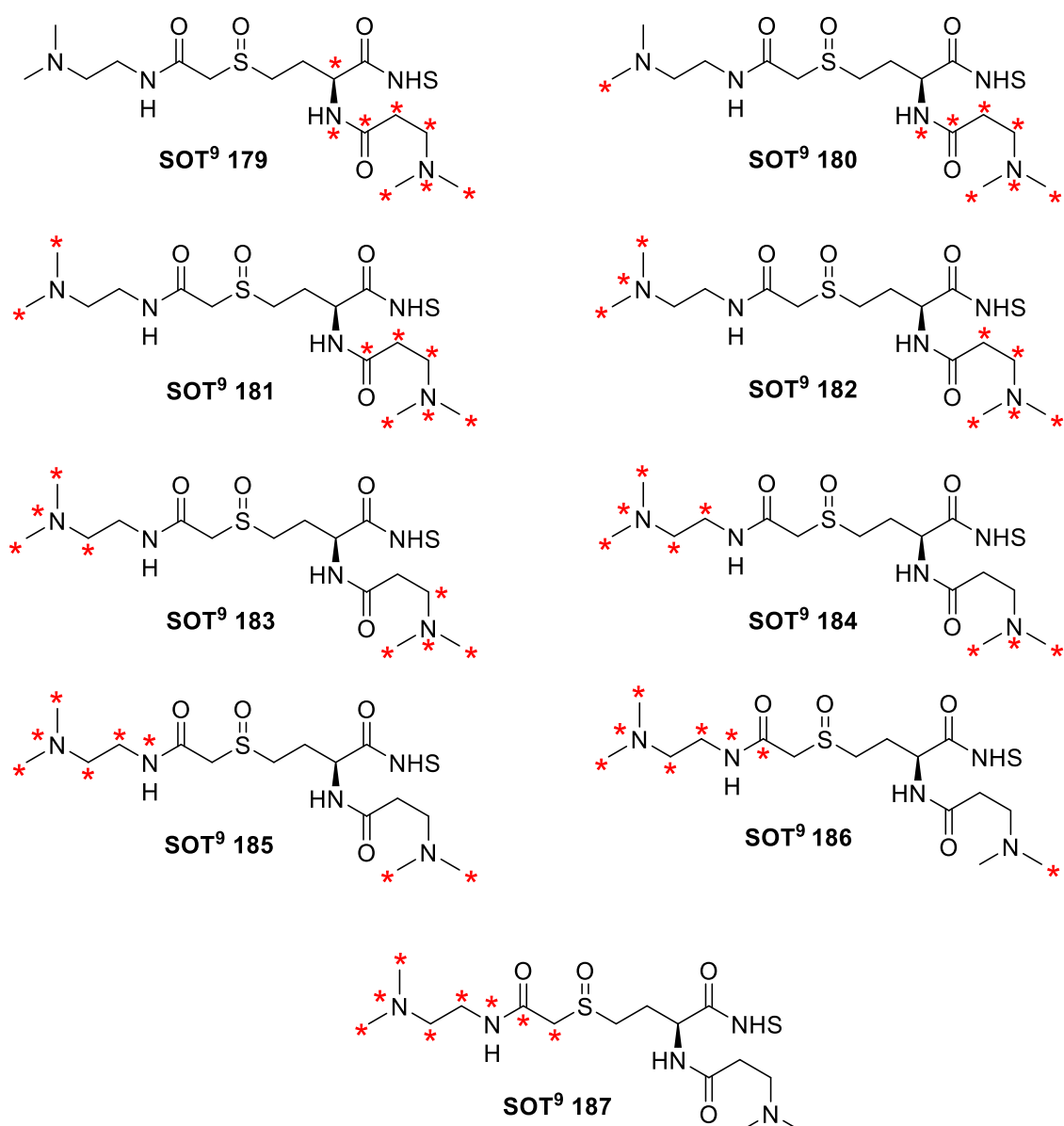
For each identified complementary ion cluster pair, the calculation is done by the Java application, and the ratio is reported in a .csv-File. Since there are only two possible y1-ions in the sample (in case of trypsin as the used protease, R and K), the y1-complementary ion cluster could still be subject to ratio distortion. Therefore, y1-complementary ion clusters are removed from the analysis to avoid the reintroduction of ratio distortion. For the quantification experiments, the background-protein median ratio was normalized to 1.

V. Additional Figures

A. SOT - Duplex



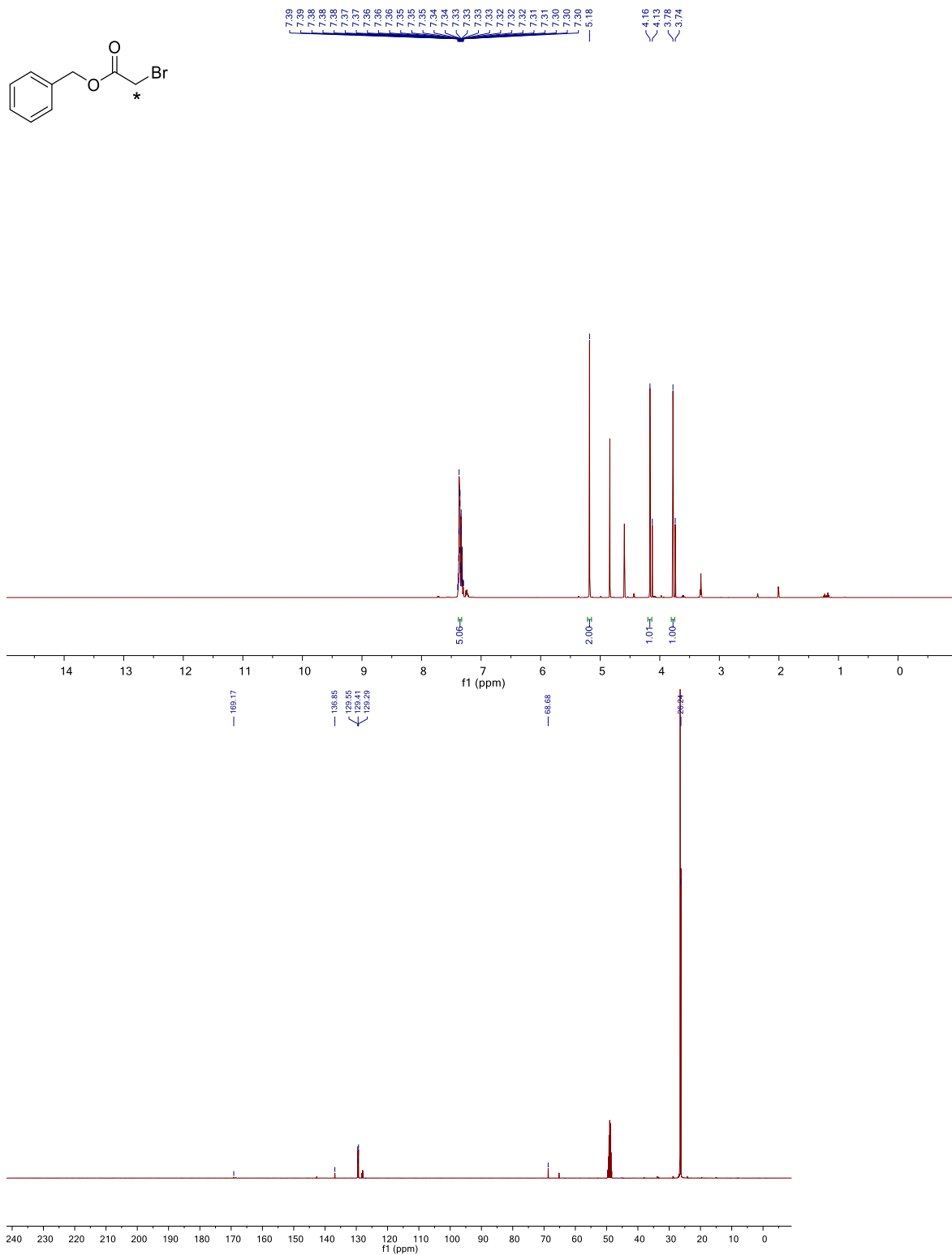
B. SOT - Nineplex Reagents (SOT⁹)



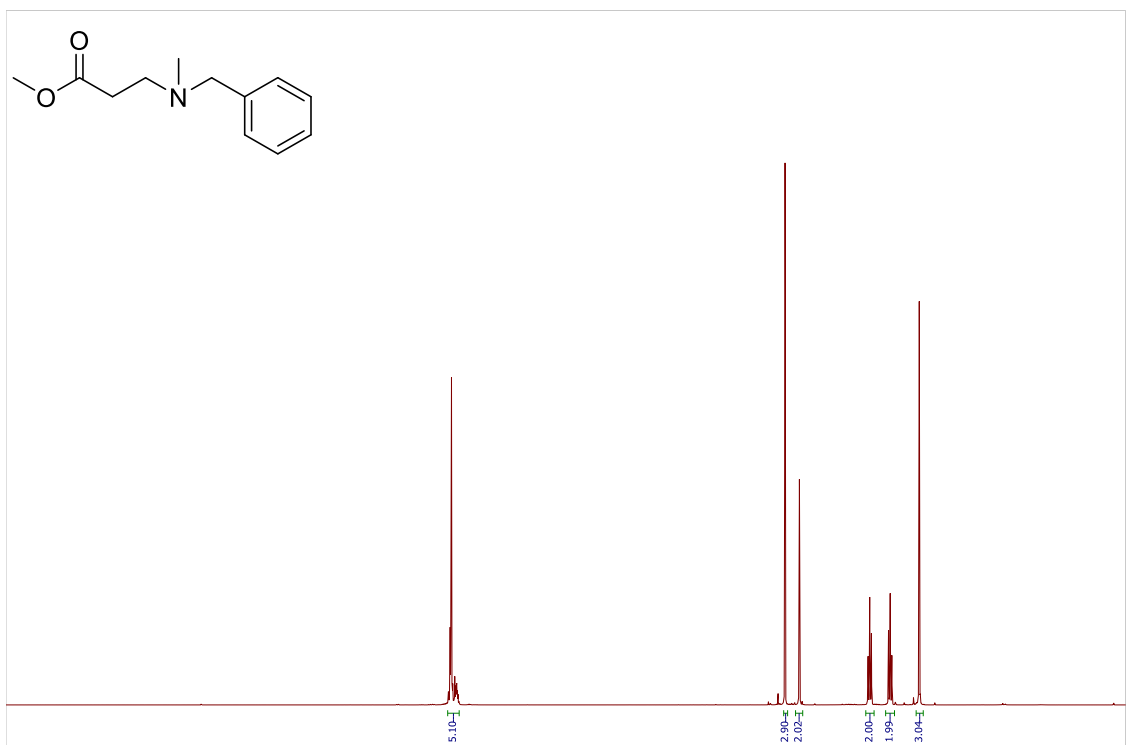
Supplementary Figure 3: A) Fragmentation behavior of the SOT duplex reagents. B) Proposed structures of the SOT-Nineplex reagent (SOT⁹). Asteriks positions indicate the presence of heavy isotopologues (¹³C, ¹⁵N).

VI. NMR spectra

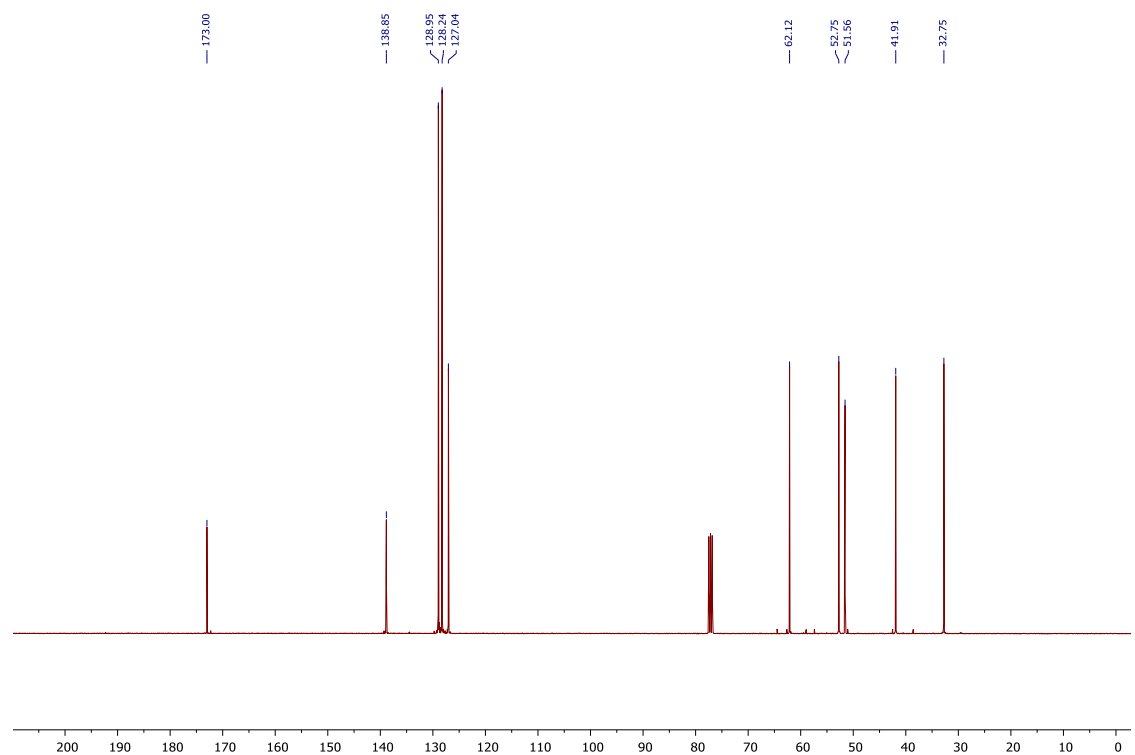
Benzyl bromo(2-¹³C)acetate (11)



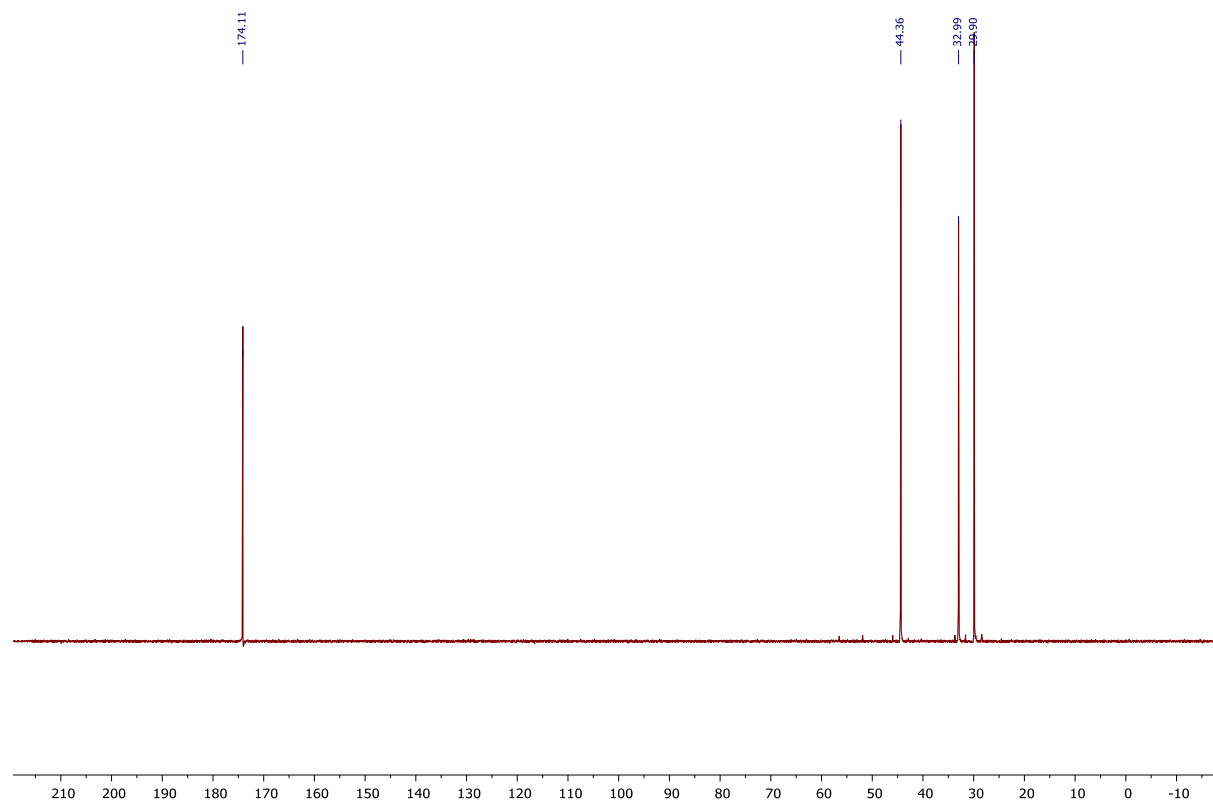
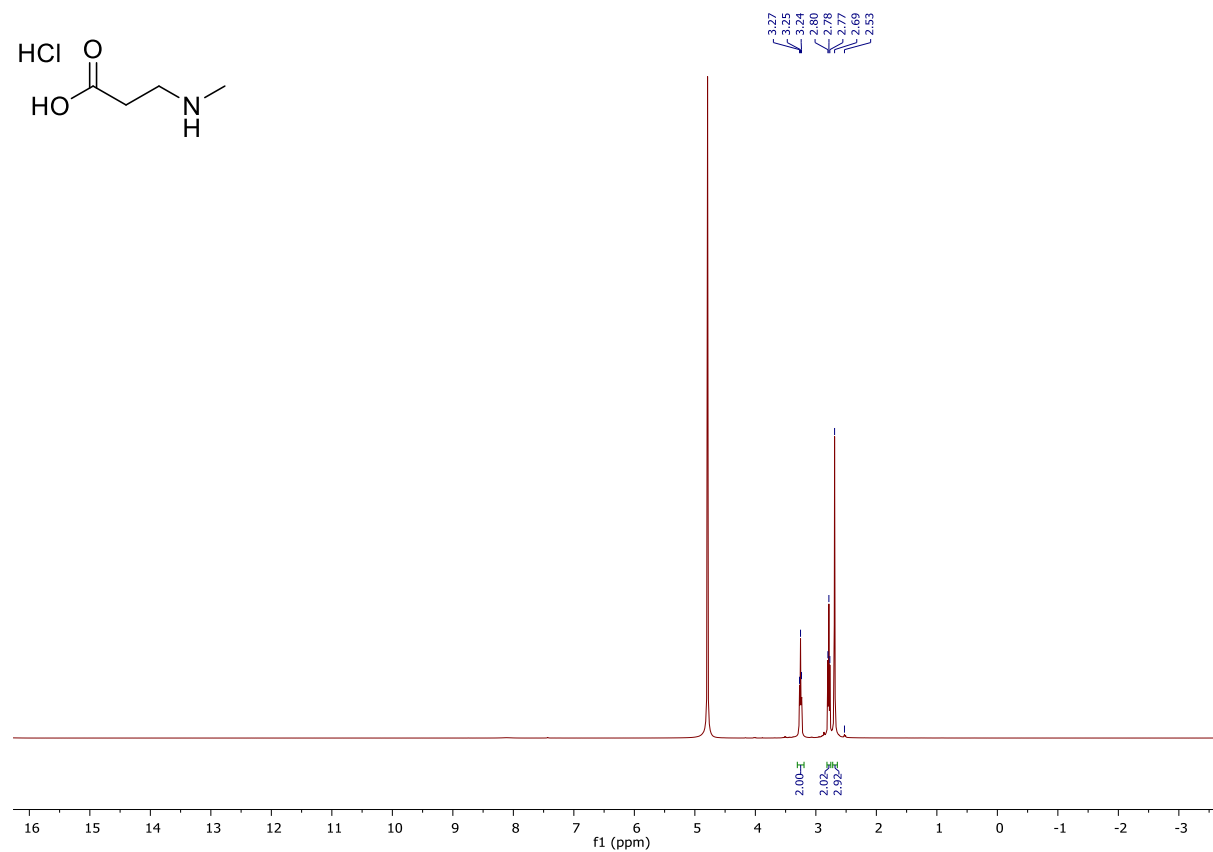
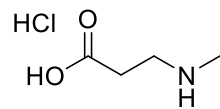
Methyl 3-[benzyl(methyl)amino]propanoate (13)



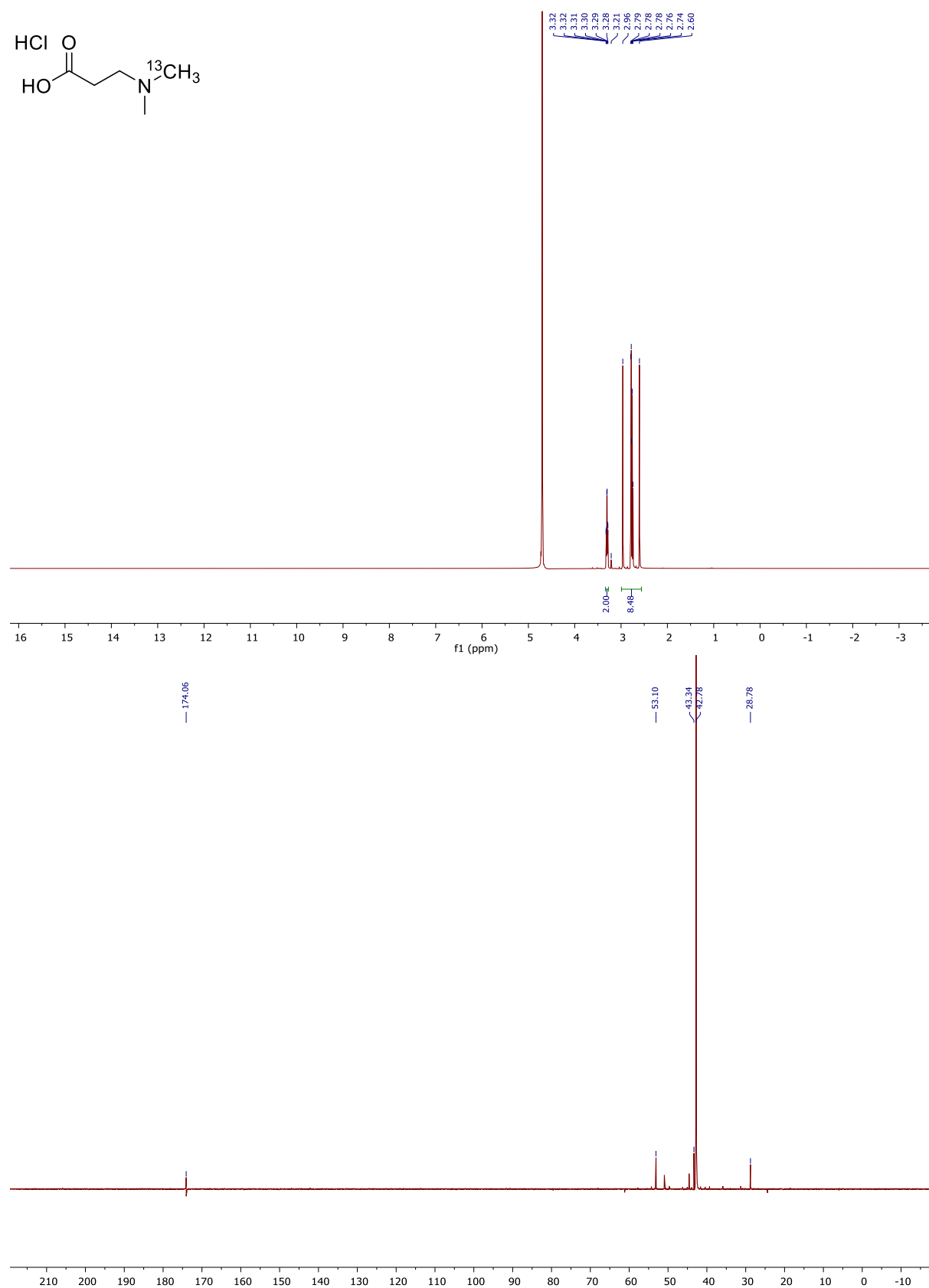
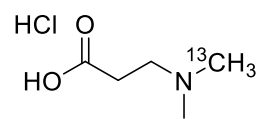
12.0 11.5 11.0 10.5 10.0 9.5 9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0



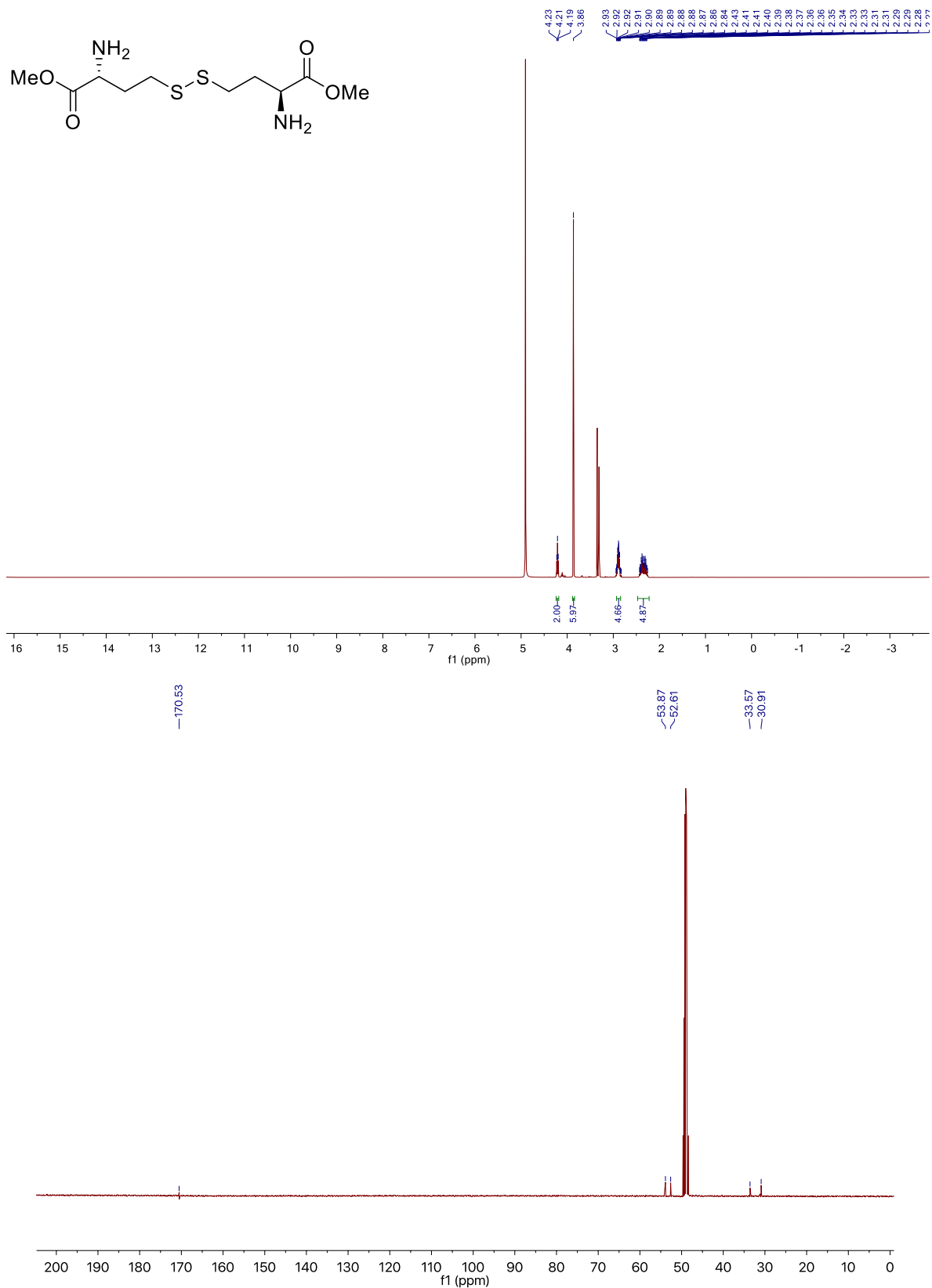
3-(Methylamino)propanoic acid hydrochloride (14)



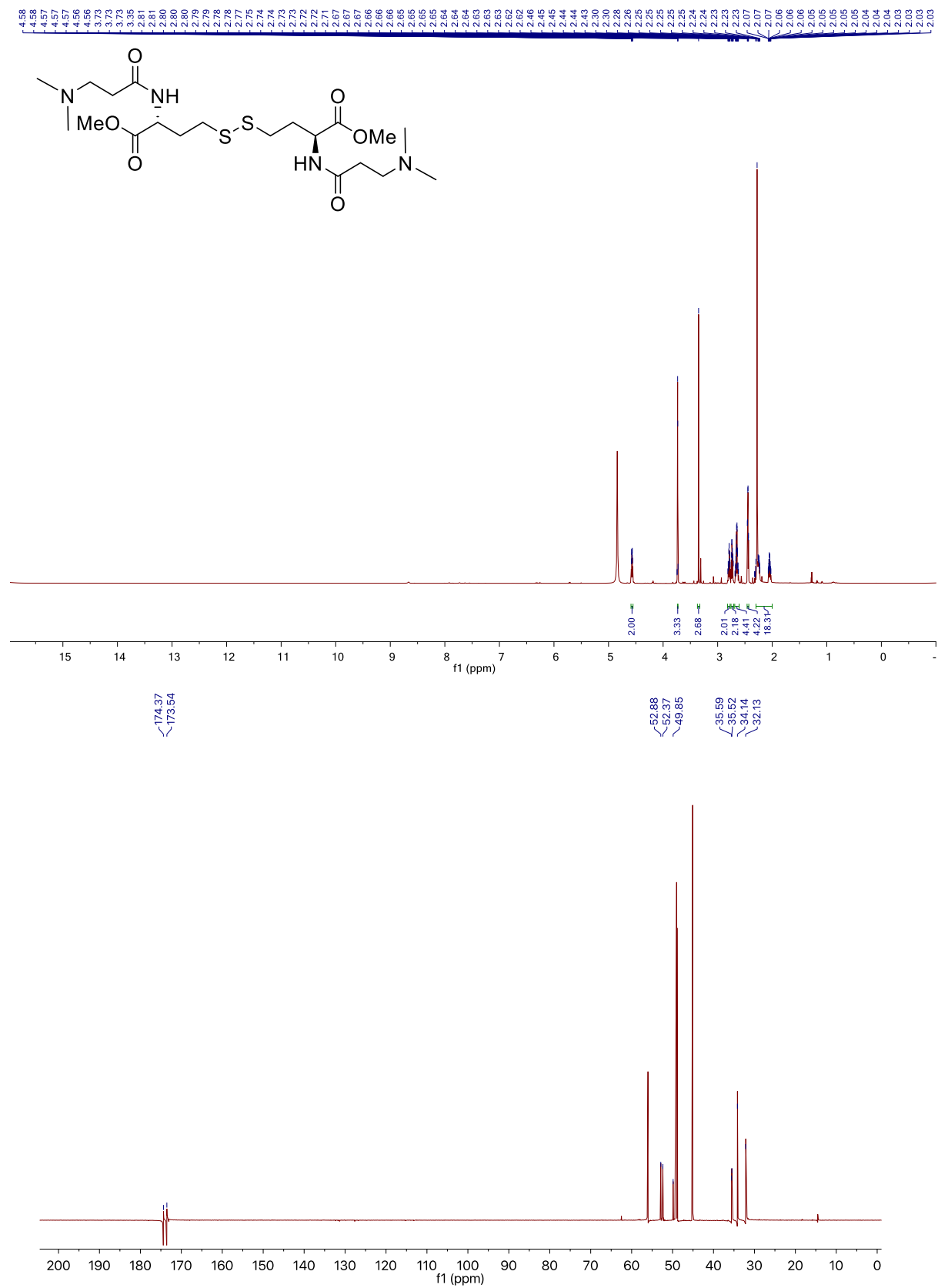
3-{Methyl[(¹³C)methyl]amino}propanoic acid hydrochloride (10)



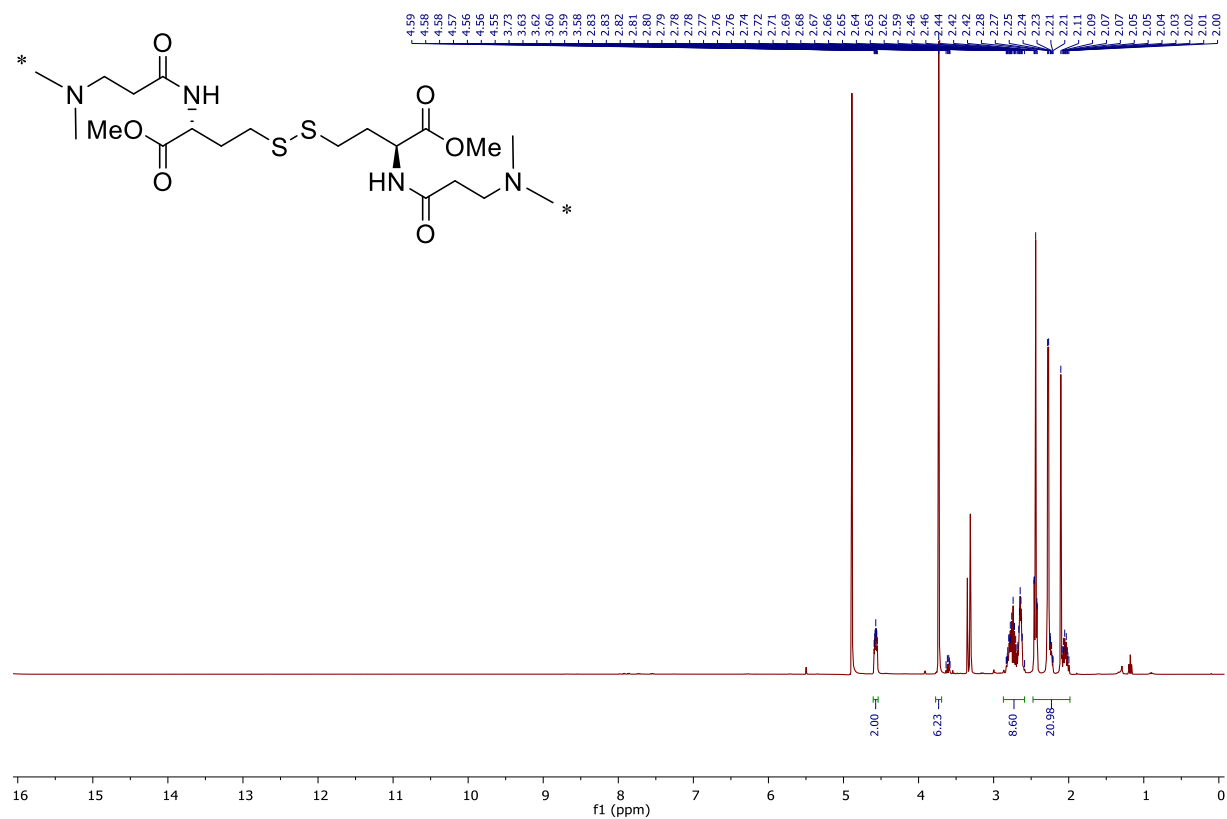
Methyl (2R)-2-amino-4-[[[(3S)-3-amino-4-methoxy-4-oxobutyl]disulfanyl]butanoate (3)



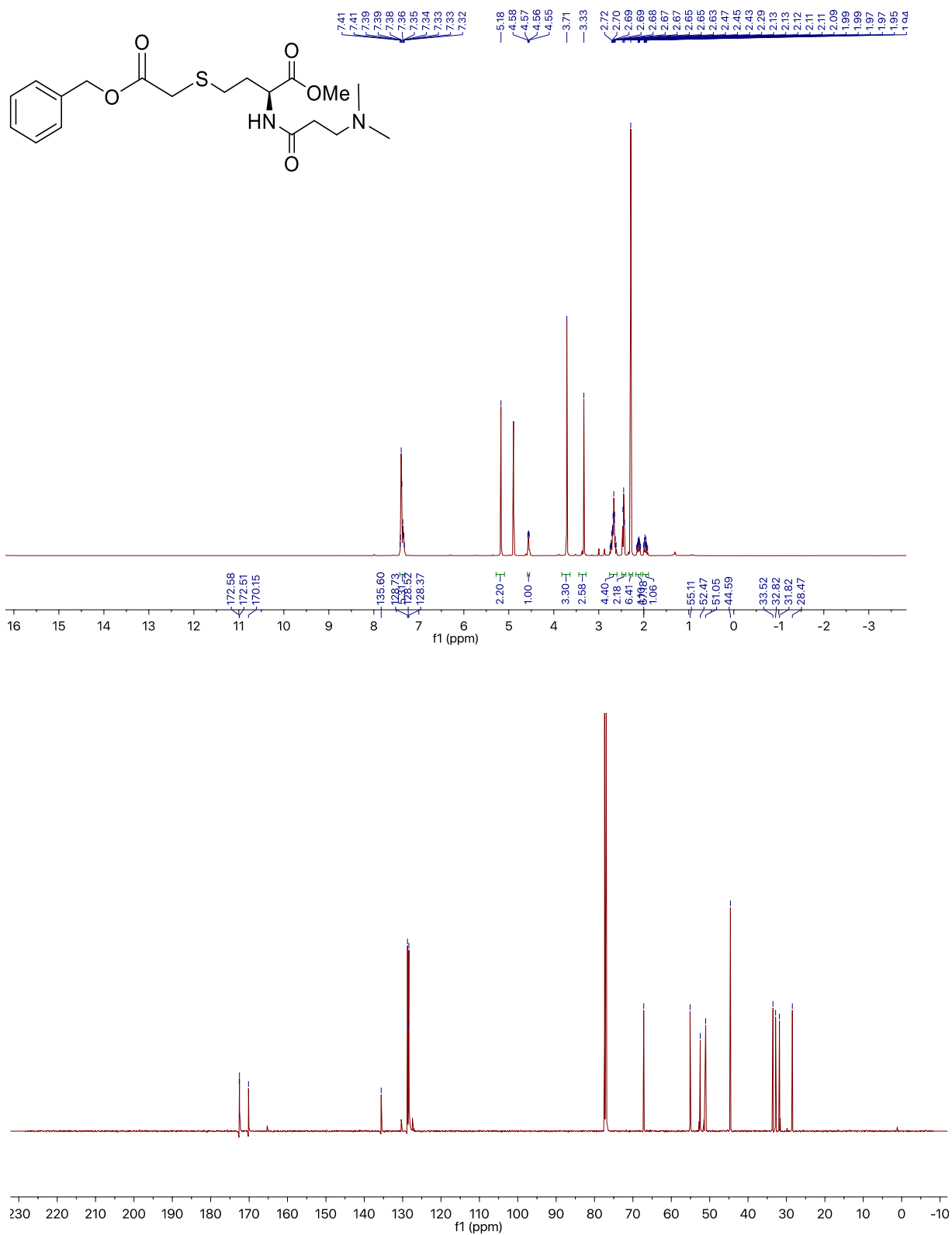
Methyl (2*R*)-2-[3-(dimethylamino)propanamido]-4-((3*S*)-3-[3-(dimethylamino)propanamido]-4-methoxy-4-oxobutyl]disulfanyl)butanoate (4)



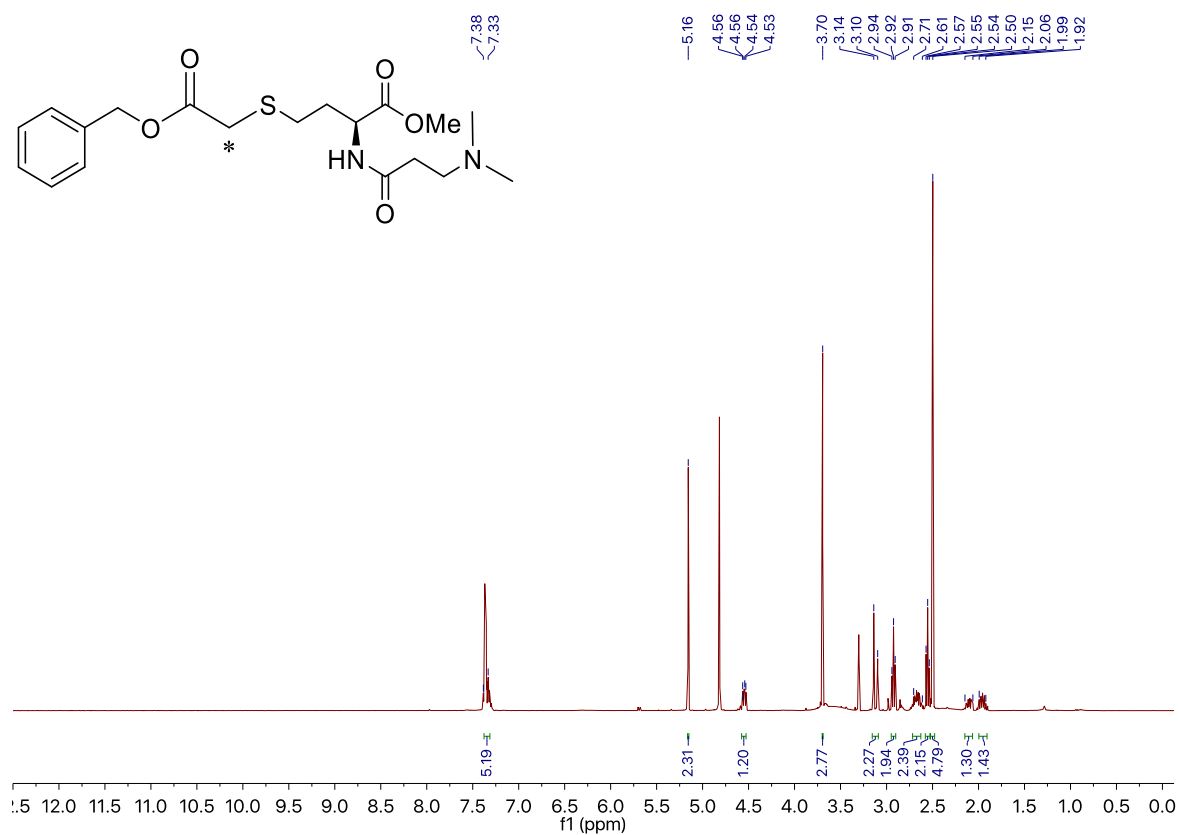
Dimethyl-4,4'-disulfanediyl(2R,2'S)-bis(2-(3-(methyl(methyl-13C)amino)-propanamido)-butanoate) (4)**



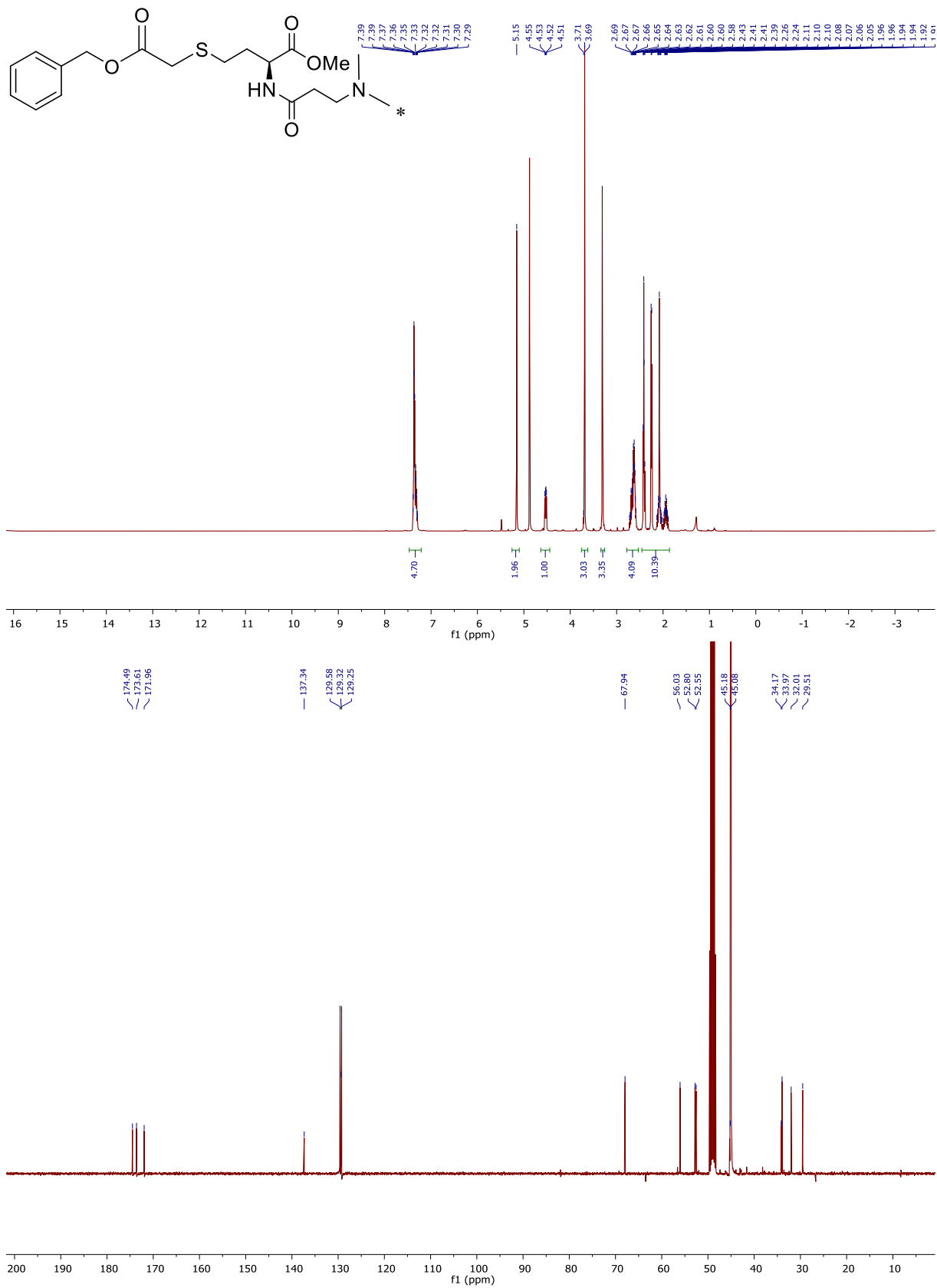
Methyl (2S)-4-[[2-(benzyloxy)-2-oxoethyl]sulfanyl]-2-[3-(dimethylamino)propanamido]butanoate (5)



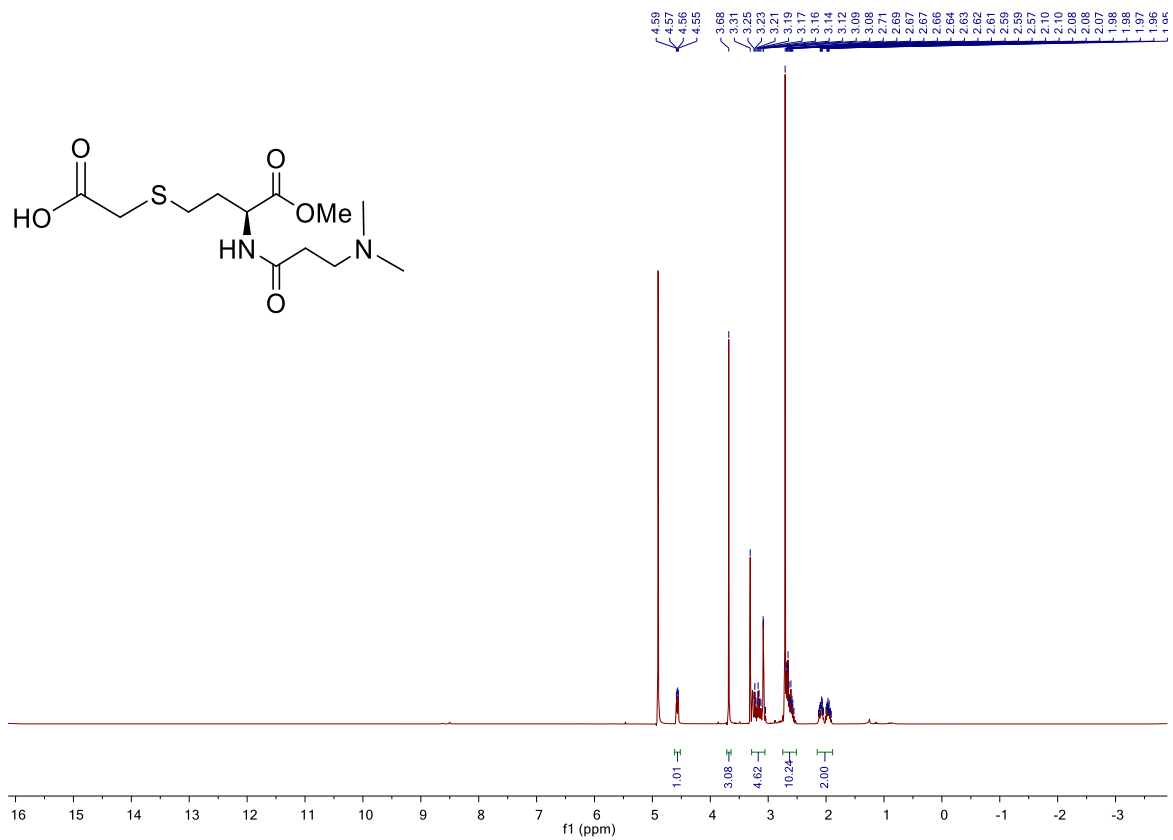
Methyl (2S)-4-[[2-(benzyloxy)-2-oxo(1-¹³C)ethyl]sulfanyl]-2-[3-(dimethylamino)propanamido]butanoate (5*)



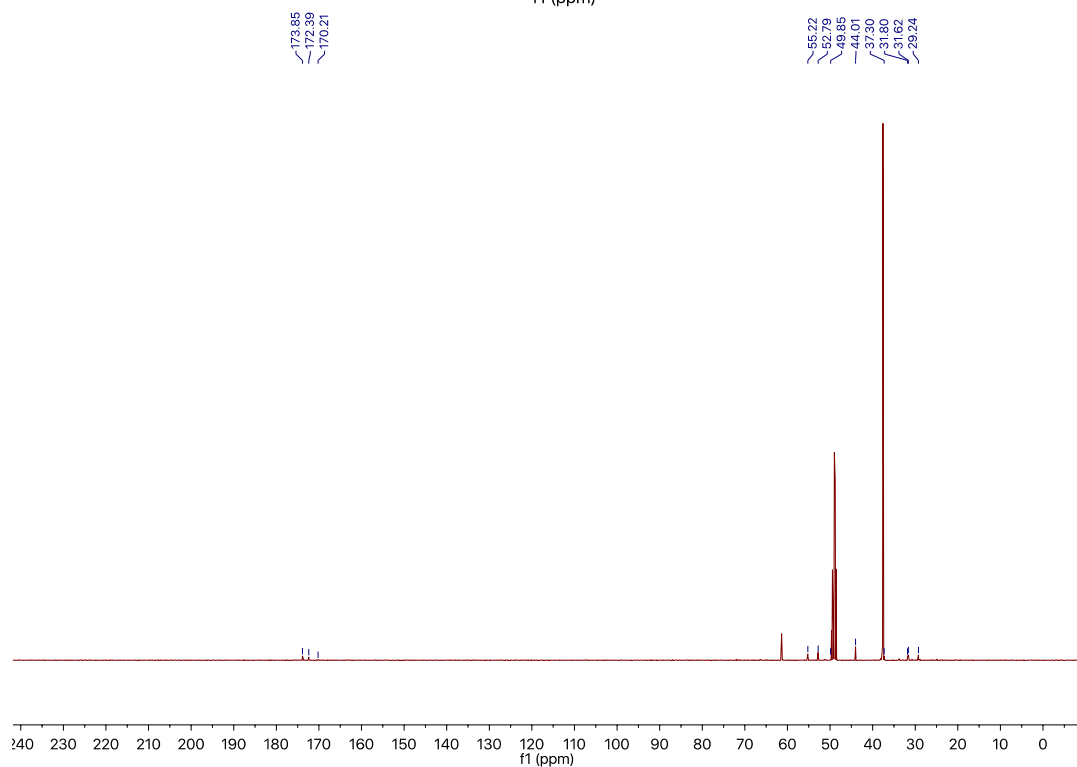
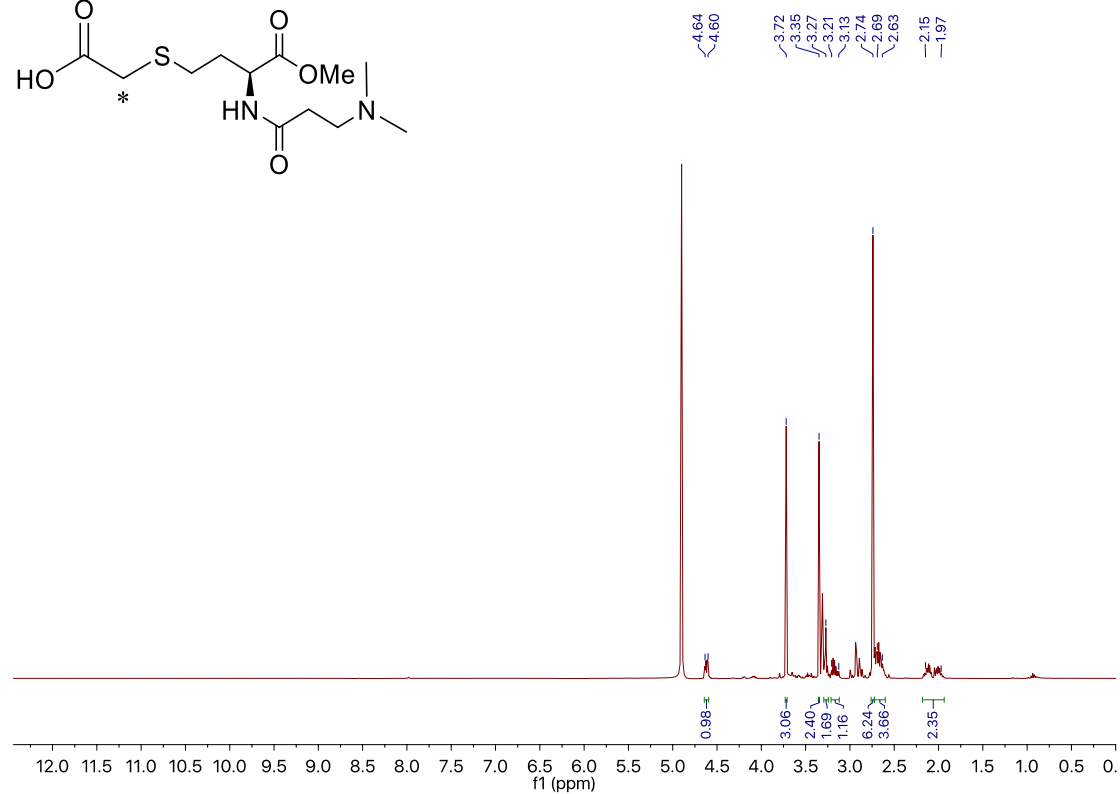
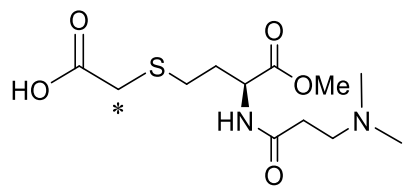
Methyl (2S)-4-[[2-(benzyloxy)-2-oxoethyl]sulfanyl]-2-(3-{methyl[(¹³C)methyl]amino}propanamido)butanoate (5)**



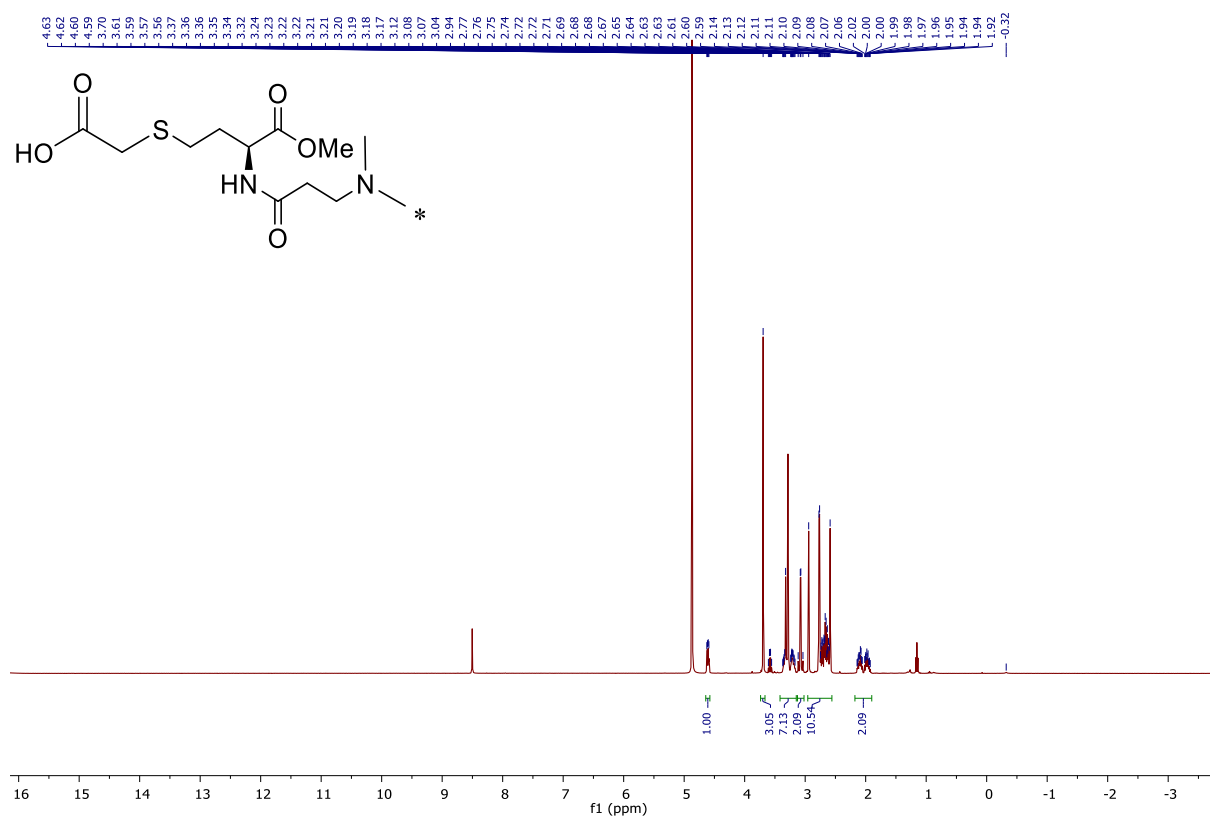
{{(3S)-3-[3-(Dimethylamino)propanamido]-4-methoxy-4-oxobutyl}sulfanyl}acetic acid (6)



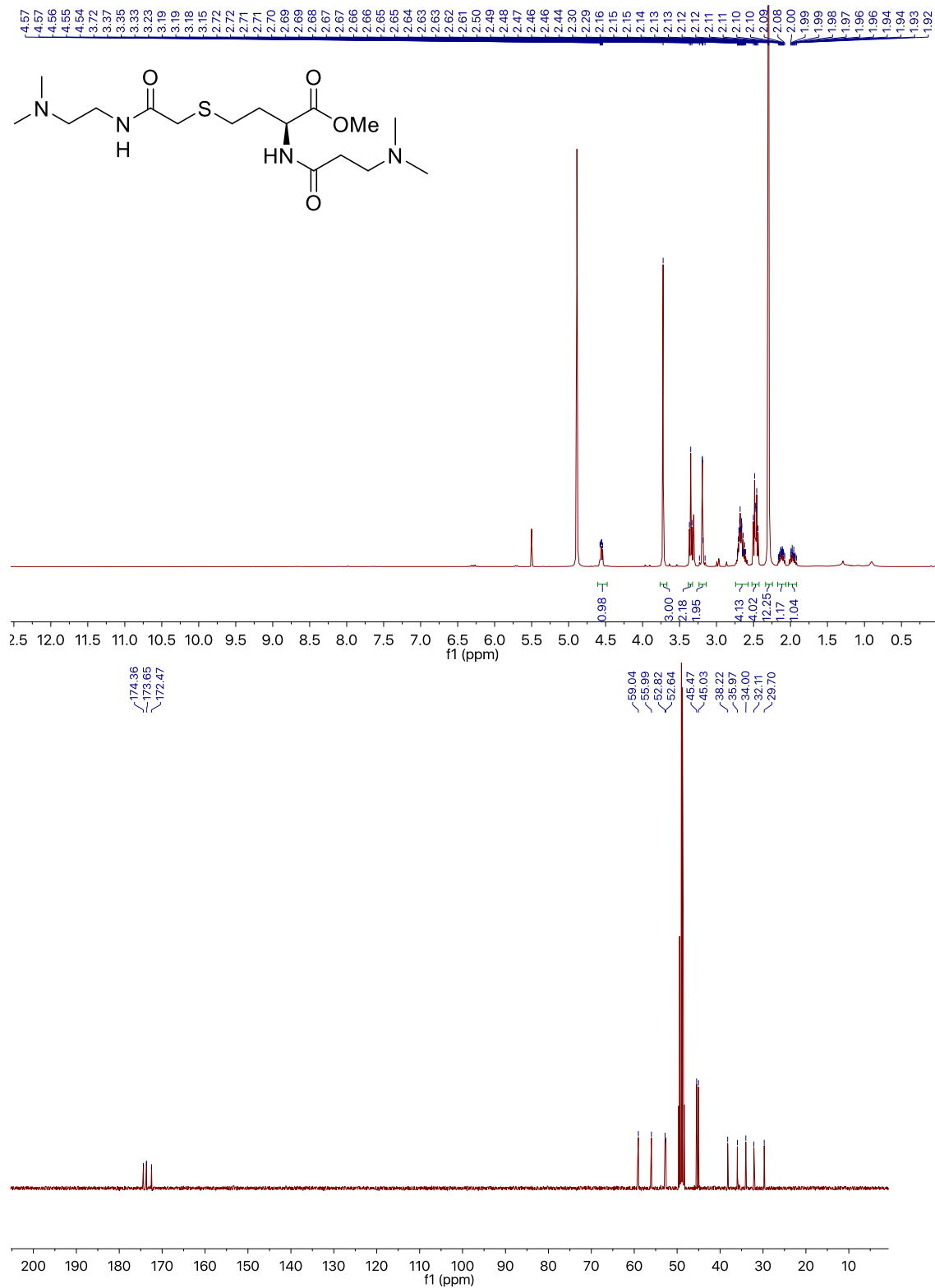
{{(3S)-3-[3-(Dimethylamino)propanamido]-4-methoxy-4-oxobutyl}sulfanyl}(2-13C)acetic acid (6*)



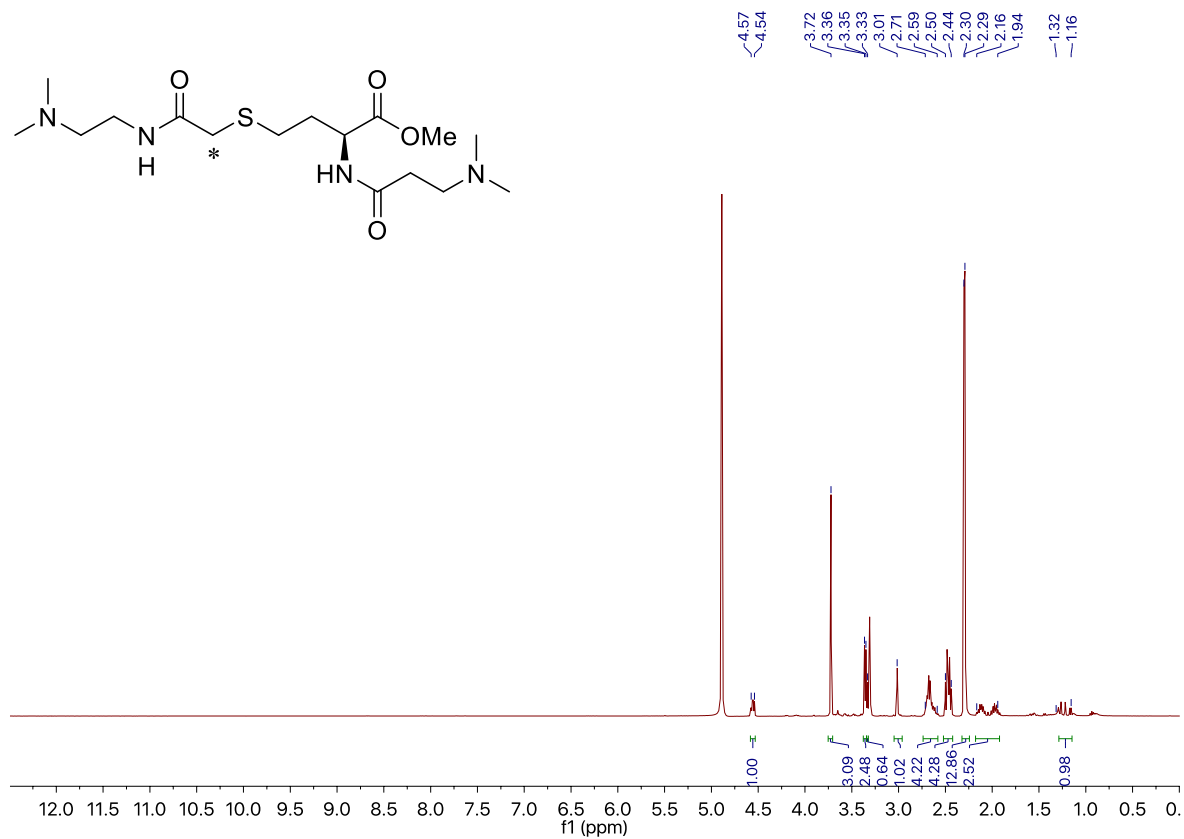
{[(3S)-4-Methoxy-3-(3-{methyl[(13C)methyl]amino}propanamido)-4-oxobutyl]sulfanyl}acetic acid (6**)



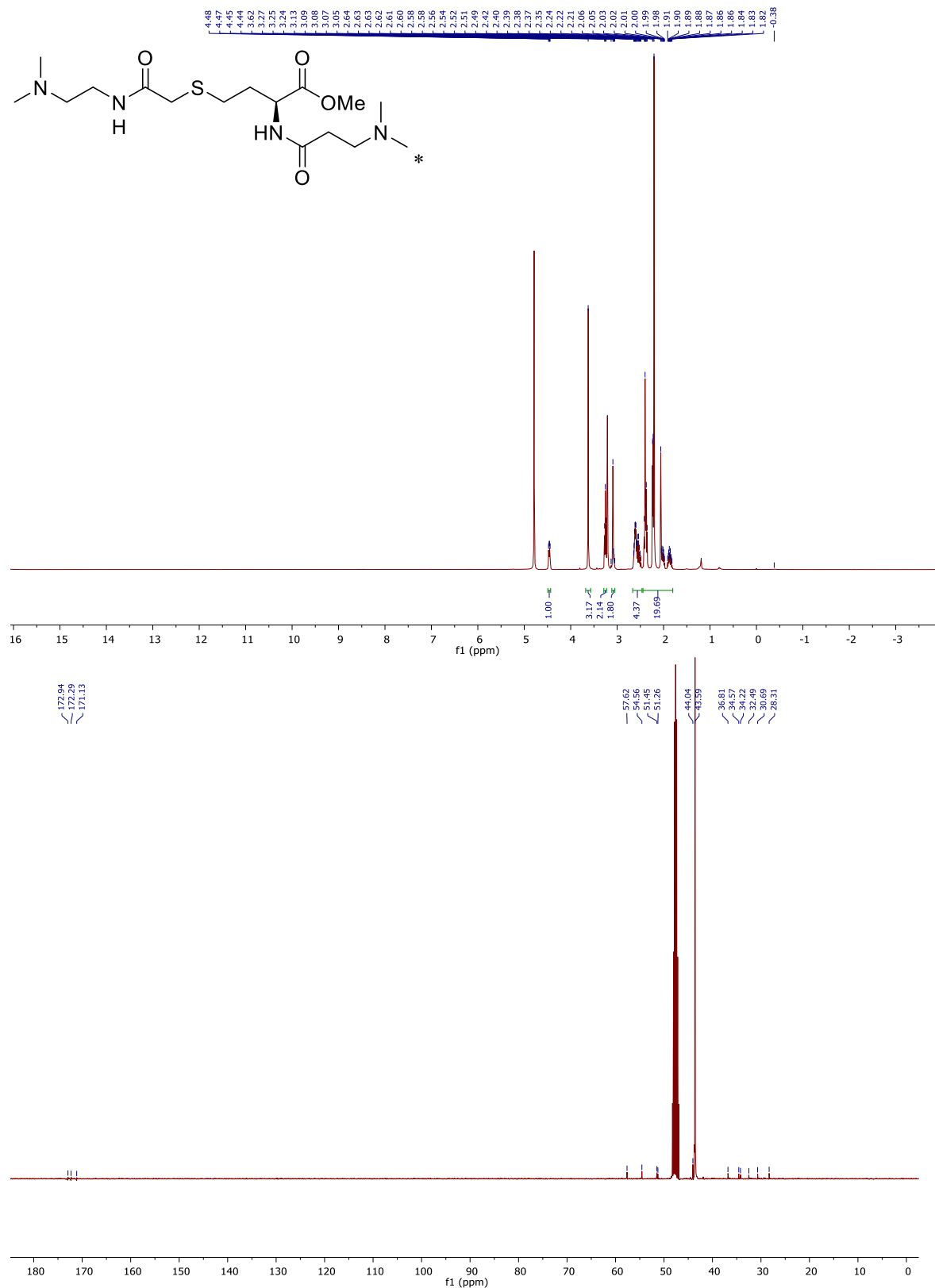
Methyl (2S)-4-[(2-[[2-(dimethylamino)ethyl]amino]-2-oxoethyl)sulfanyl]-2-[3-(dimethylamino)propanamido]butanoate (7)



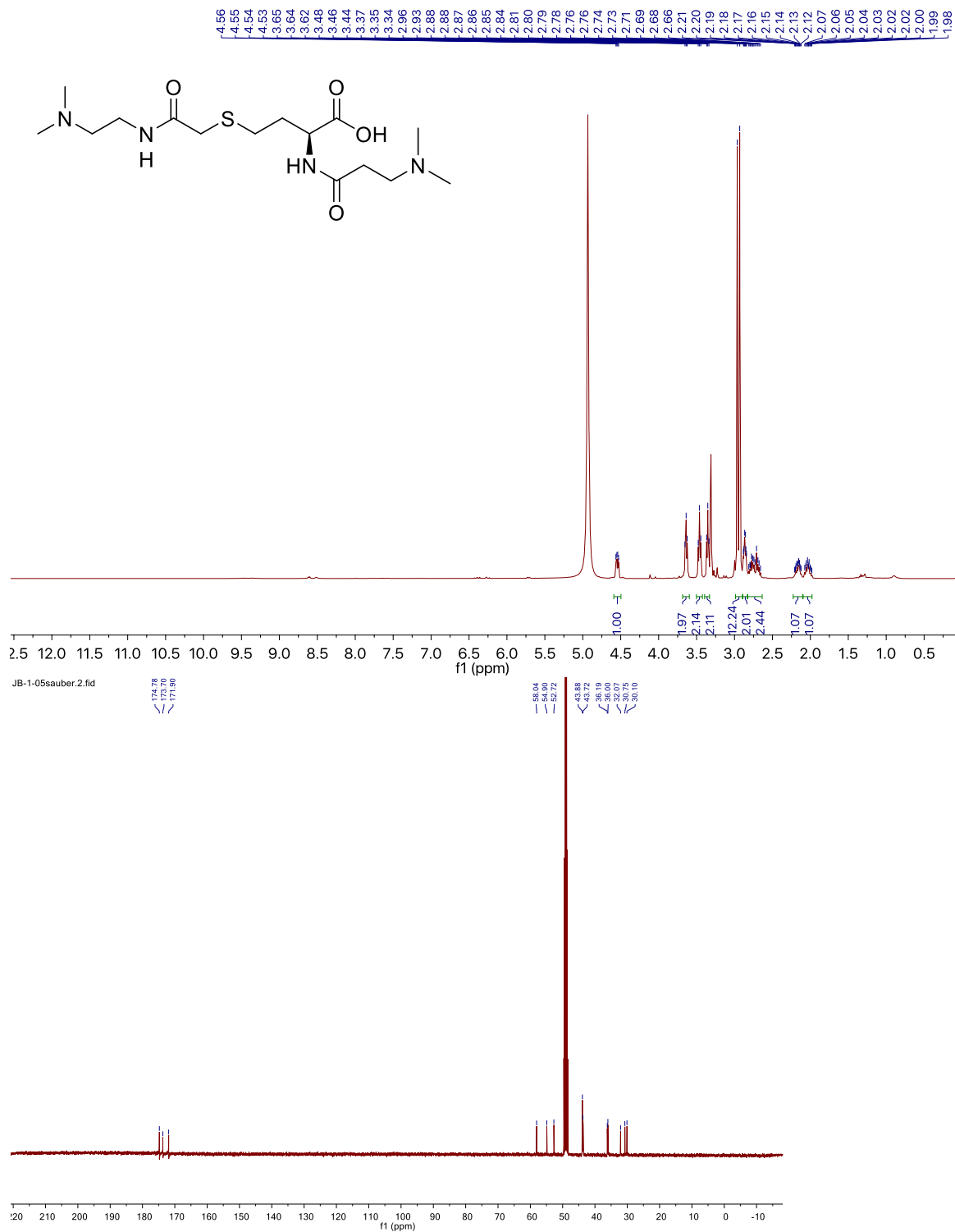
Methyl (2S)-4-[[2-[[2-(dimethylamino)ethyl]amino]-2-oxo(1-¹³C)ethyl]sulfanyl]-2-[3-(dimethylamino)propanamido]butanoate (7*)



Methyl (2S)-4-[(2-[[2-(dimethylamino)ethyl]amino]-2-oxoethyl)sulfanyl]-2-(3-{methyl[¹³C]methyl}amino)propanamido)butanoate (7)**

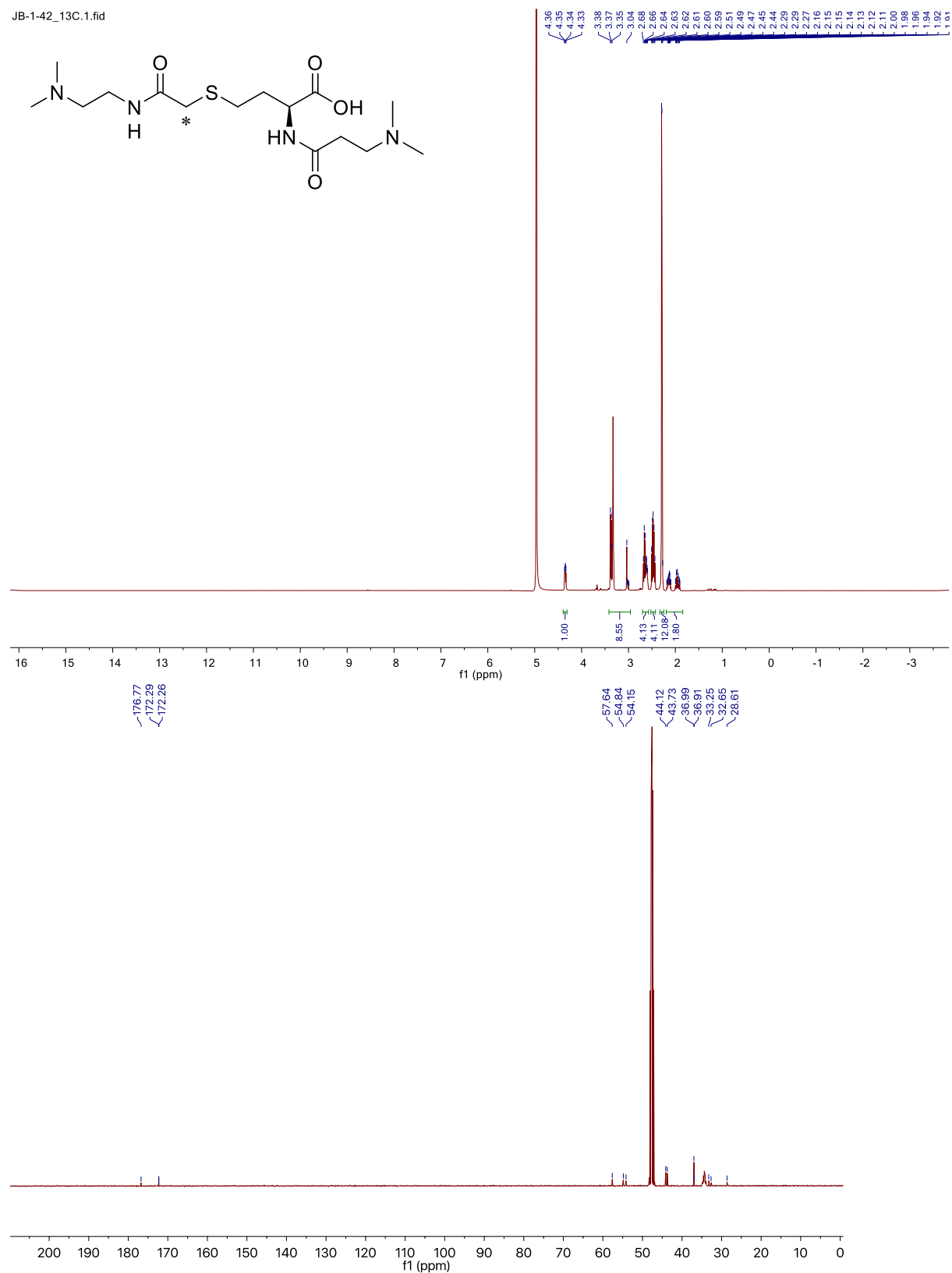


(2S)-4-[(2-{[2-(Dimethylamino)ethyl]amino}-2-oxoethyl)sulfanyl]-2-[3-(dimethylamino)propanamido]butanoic acid (8)

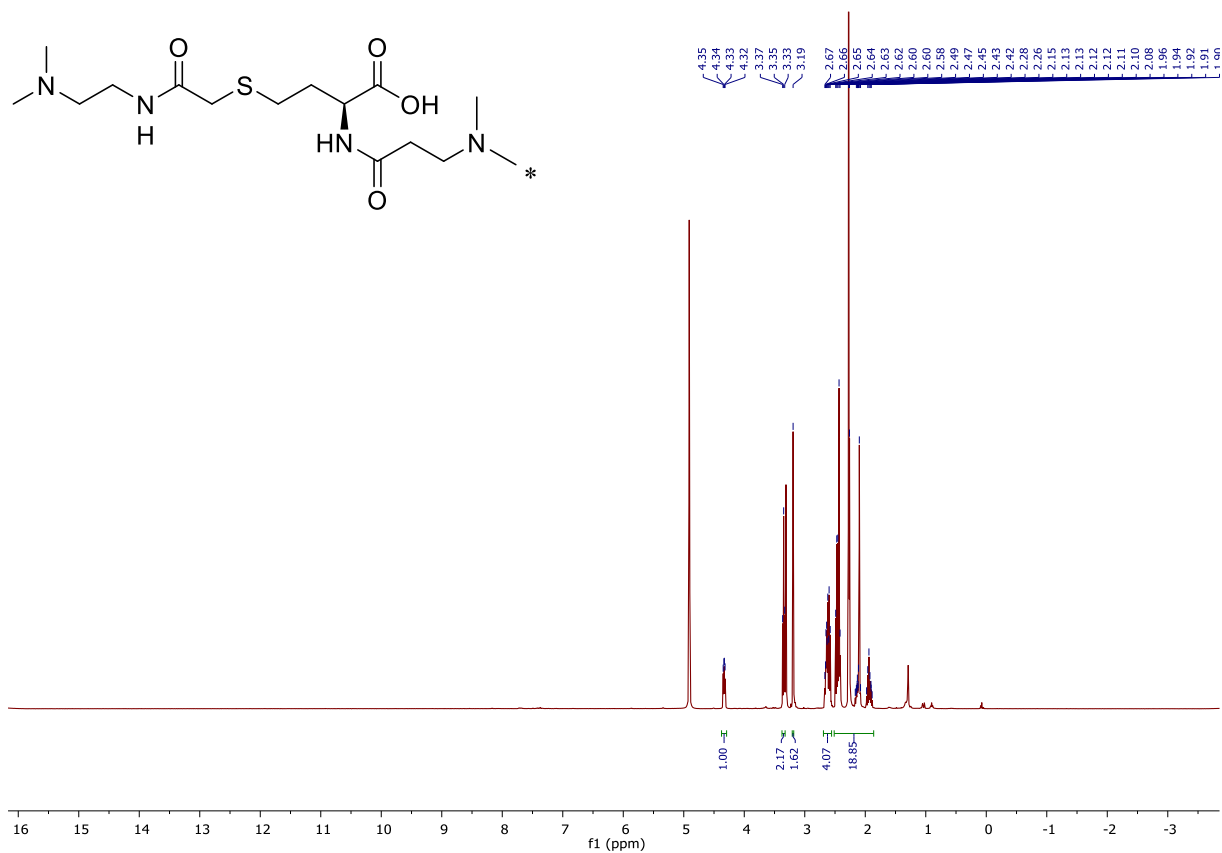


(2S)-4-[[2-[[2-(Dimethylamino)ethyl]amino]-2-oxo(1-¹³C)ethyl]sulfanyl]-2-[3-(dimethylamino)propanamido]butanoic acid (8*)

JB-1-42_13C.1.fid

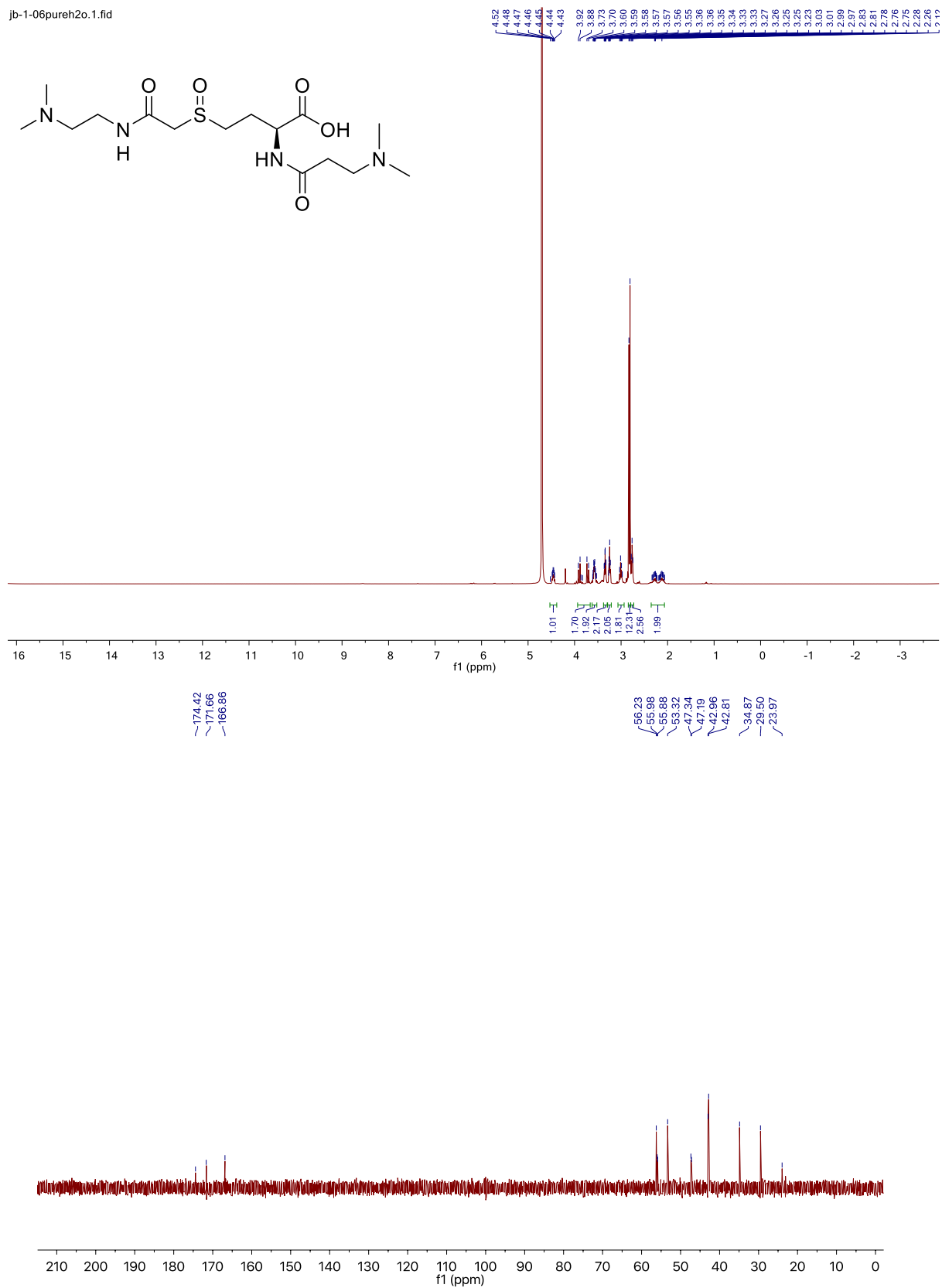


(2S)-4-[(2-{[2-(Dimethylamino)ethyl]amino}-2-oxoethyl)sulfanyl]-2-(3-{methyl[(¹³C)methyl]amino}propanamido)butanoic acid (8)**



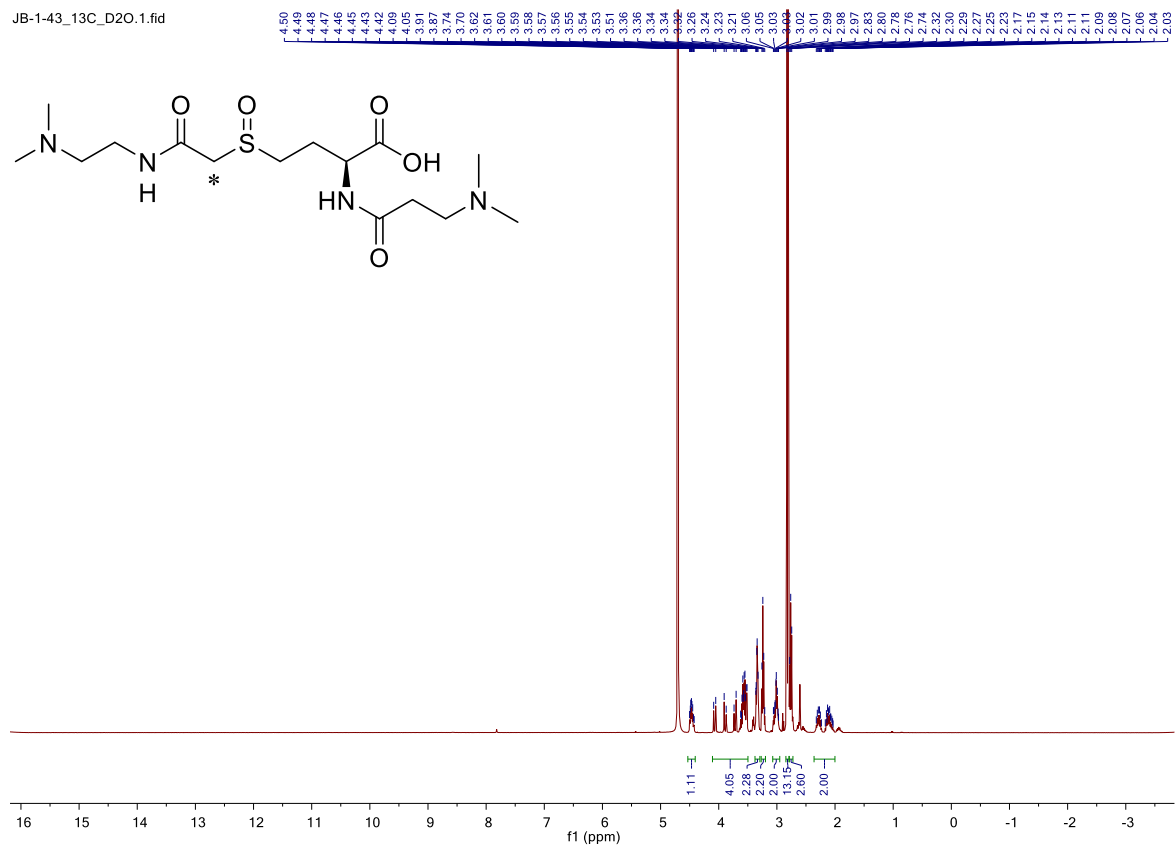
(2S)-4-(2-[[2-(Dimethylamino)ethyl]amino]-2-oxoethanesulfinyl)-2-[3-(dimethylamino)propanamido]-butanoic acid (9)

jb-1-06pureh2o.1.fid

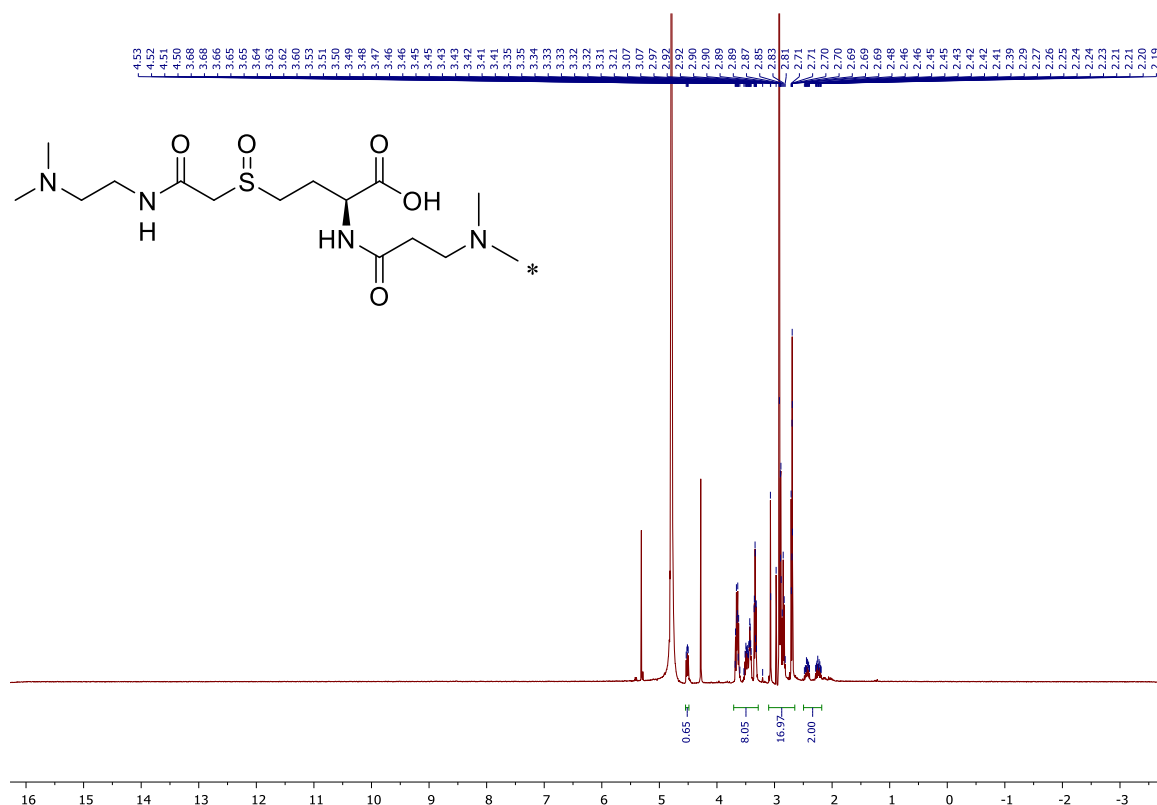


(2S)-4-[2-[[2-(Dimethylamino)ethyl]amino]-2-oxo(1-¹³C)ethanesulfinyl]-2-[3-(dimethylamino)propanamido]-butanoic acid (9*)

JB-1-43_13C_D2O.1.fid



(2S)-4-(2-([2-(Dimethylamino)ethyl]amino)-2-oxoethanesulfinyl)-2-(3-{methyl[(¹³C)methyl]amino}propanamido)butanoic acid (9)**



- [1] R. Torres Martin de Rosales, R. Tavaré, R. L. Paul, M. Jauregui-Osoro, A. Protti, A. Glaria, G. Varma, I. Szanda, P. J. Blower, *Angew. Chem. International Edition* **2011**, *50*, 5509-5513.
- [2] A. J. McShane, Y. Shen, M. J. Castillo, X. Yao, *J. Am. Soc. Mass Spectr.* **2014**, *25*, 1694-1704.
- [3] W. Eschweiler, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1905**, *38*, 880-882.
- [4] H. T. Clarke, H. B. Gillespie, S. Z. Weisshaus, *J. Am. Chem. Soc.* **1933**, *55*, 4571-4587.
- [5] N. A. Kulak, G. Pichler, I. Paron, N. Nagaraj, M. Mann, *Nat. Methods* **2014**, *11*, 319-324.
- [6] J. Cox, M. Mann, *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 1367-1372.
- [7] J. Griss, F. Reisinger, H. Hermjakob, J. A. Vizcaíno, *Proteomics* **2012**, *12*, 795-798.
- [8] J. Meija, B. Coplen Tyler, M. Berglund, A. Brand Willi, P. De Bièvre, M. Gröning, E. Holden Norman, J. Irrgeher, D. Loss Robert, T. Walczyk, T. Prohaska, *Pure Appl. Chem.* **2016**, *88*, 265.