AT-SCP

Austrian Single Cell Proteomics Platform

Programm / Ausschreibung	F&E Infrastruktur, F&E Infrastruktur, F&E Infrastrukturförderung 4. Ausschreibung 2022/01	**Status**	laufend
Projektstart	01.08.2023	**Projektende**	31.07.2025
Zeitraum	2023 - 2025	**Projektlaufzeit**	24 Monate
Keywords	Single Cell Proteomics, Mass Spectrometry		

Projektbeschreibung

Proteine sind die treibende Kraft hinter den zellulären Funktionen, und dennoch ist das Proteom einer einzelnen Zelle bisher nur unzureichend verstanden. Der Schlüssel zur Beantwortung grundlegender biologischer Fragen liegt in der Einzelzellproteomik (Single Cell Proteomics, SCP), einer aufstrebenden Technologie, die durch bedeutende technologische Verbesserungen in den letzten Jahren ermöglicht wurde. Die detaillierte Charakterisierung einzelner Zellen mit Hilfe der Massenspektrometrie (MS) ist daher von großem Wert für die Untersuchung der Heterogenität komplexer Systeme. Im Gegensatz zur Einzelzellgenomik befindet sich die SCP noch in einem frühen Stadium der technischen Reife. Minimale Probenmengen und fehlende Vervielfältigungsmethoden für Proteine machen SCP zu einer großen Herausforderung.

Die Proteomics Core Facility (CF) am Vienna BioCenter Campus (VBC) hat bereits 2018 Pionierarbeit mit Einzelzellproteomikexperimenten mit kleinsten Probenmengen geleistet. Basierend auf diesen frühen Arbeiten haben wir den Bedarf an neuartigen, verlustfreien Protokollen für die Probenvorbereitung und an hochempfindlichen MS-Instrumenten als Schlüsselanforderungen für zukünftige Studien im Bereich der Einzelzell-Proteomik identifiziert. Zu diesem Zweck haben wir im Jahr 2019 die 1st European Single Cell Conference organisiert und mit Cellenion zusammengearbeitet, einem Unternehmen, das sich auf das Pipettieren von kleinsten Volumina (50 pl) spezialisiert hat. Das Ergebnis dieses Vorzeigeprojekts ist die Entwicklung eines präzisen und reproduzierbaren Probenvorbereitungsprotokolls unter Verwendung eines Pikoliter-Handling-Robotersystems. Inzwischen nutzen die meisten renommierten akademischen Forschungsgruppen, die sich mit Einzelzellproteomik beschäftigen, dieses automatisierte System (cellenONE®, Cellenion), um eine effiziente Probenvorbereitung in miniaturisierten Hochdurchsatzvolumina zu ermöglichen.

Aufbauend auf diesem Erfolg und der erworbenen Expertise wollen wir nun eine neue, hochmoderne Einheit für Einzelzellproteomik aufbauen. Diese Einheit wird die Einzelzellproteomik vom derzeitigen Entwicklungsstadium zu einer robusten Technik weiterentwickeln, die der europäischen Forschungsgemeinschaft als kooperative Dienstleistung angeboten werden kann. Diese Einheit, die ausschließlich der Forschung und Entwicklung gewidmet sein wird, wird ein Spin-off unseres früheren Proteomics CF sein, mit dem Ziel, unsere Anstrengungen im Bereich der Forschung und Entwicklung zu beschleunigen. Eine solche Infrastruktur wäre unseres Wissens die erste ihrer Art in Österreich und Europa.

Um eine erfolgreiche Methodenentwicklung auf dem dynamischen und anspruchsvollen Gebiet der Einzelzell-Proteomik zu gewährleisten, benötigen wir Massenspektrometer und Probenvorbereitungssysteme auf dem neuesten Stand der Technik. Dazu gehört der cellenONE Roboter, der eine reproduzierbare Handhabung der Proben ermöglicht. Für die Detektion und exakte Quantifizierung werden darüber hinaus die empfindlichsten und schnellsten Massenspektrometer benötigt. Dazu gehören Geräte wie Orbitrap Ascend Tribrid (Thermo) und timsTOF SCP (Bruker), beide mit bisher unerreichter Empfindlichkeit und Geschwindigkeit.

Nach erfolgreicher Implementierung werden wir die grundlegenden offenen Fragen der menschlichen Gehirnentwicklung mit Hilfe von Organoiden in Zusammenarbeit mit der Knoblich-Gruppe (Institut für Molekulare Biotechnologie, Österreichische Akademie der Wissenschaften) angehen. Weiters planen wir die Etablierung transversaler (institutionenübergreifender) Workflows mit unserer CF für Pflanzenforschung.

Die Einzelzell-Omik wird in naher Zukunft die zelluläre Heterogenität von einer Quelle des Rauschens in eine Quelle der Entdeckung verwandeln. Dies wird zu einem besseren Verständnis der Beziehungen zwischen Expression, Funktion und Identität multizellulärer Subtypen beitragen, was für nachgelagerte Anwendungen wie die Früherkennung von Krankheiten oder die Entwicklung maßgeschneiderter Therapien von Bedeutung ist.

Abstract

Proteins are the main drivers of cellular function, and yet the proteome of single cells is poorly understood. Single-cell proteomics (SCP) is an emerging technology enabled by significant technological improvements over the last years and is key to answering fundamental biological questions. Hence, in-depth characterization of individual cells using mass spectrometry (MS)-based proteomics would be highly valuable to studying the heterogeneity within complex systems. In contrast to single-cell genomics, SCP is still at an early stage of technical maturity. The lack of any amplification method for proteins makes SCP far more challenging due to minimal sample input.

The Proteomics core facility (CF) at the Vienna BioCenter Campus (VBC) pioneered experiments with ultra-low input proteomic samples from single cells starting in 2018. Based on this early work, we have identified the need for novel, lossless sample preparation protocols and high-sensitivity MS instruments as key requirements for future single-cell proteomics studies. To this end, we organized the 1st European Single Cell Conference in 2019 and collaborated with Cellenion, a company specializing in pipetting minimal volumes (50 pl). This lighthouse project developed an accurate and reproducible sample preparation protocol using a picolitre handling robotic system. By now, most renowned academic research groups working in single-cell proteomics use this automated system (cellenONE®, Cellenion) to enable efficient sample preparation in miniaturized volumes and with high throughput.

Based on this success and our gained expertise, we now aim to establish a novel state-of-the-art single-cell proteomics unit, pushing single-cell proteomics from its current developmental stage to a robust technique that can be offered as a collaboration service to the European research community. This unit dedicated entirely to R&D will be a spin-off of our former Proteomics CF to accelerate our R&D efforts. To our knowledge, such an infrastructure would be the first of its kind in Austria and Europe.
However, this requires the appropriate technical equipment we request in this application. State-of-the-art mass spectrometers and sample preparation handling systems are needed to ensure successful method development in the

dynamic and challenging single-cell proteomics field. This includes the cellenONE robot allowing reproducible sample handling. Furthermore, the most sensitive and fast mass spectrometers are needed to enable detection and accurate quantification. This includes devices such as the Orbitrap Ascend Tribrid (Thermo) and the timsTOF SCP (Bruker), both showing unprecedented sensitivity and speed.

Upon successful implementation, we will tackle the fundamental open questions of human brain development using organoids in collaboration with the Knoblich group (Institute of Molecular Biotechnology Austria, Austrian Academy of Sciences). Additionally, we plan to establish transverse (cross-facility) workflows with our Plant Sciences CF.

Single-cell omics will very soon unveil cellular heterogeneity from a source of noise to a source of discoveries. This will help deepen our understanding of the relationship between the expression, function, and identity of multicellular subtypes connected to downstream applications like early disease diagnosis or the development of tailored therapies.

Endberichtkurzfassung

The project has successfully delivered on all its objectives, resulting in a transformative upgrade of the proteomics infrastructure and capabilities at the Vienna BioCenter Core Facilities (VBCF). In total, three state-of-the-art mass spectrometers -including two Orbitrap Astral instruments-and one picoliter dispensing robot for ultra-low volume sample preparation have been installed and fully integrated into the existing infrastructure. These instruments are now operational and serve a broad user base across campus and beyond.

The new instrumentation has enabled the development and implementation of advanced workflows tailored for low-input and single-cell proteomics , significantly expanding the analytical scope and throughput of the platform. The picoliter dispensing robot, in particular, has been instrumental in miniaturizing sample preparation workflows, reducing sample loss and enabling robust analysis of minute biological material.

As a direct result of the enhanced capabilities, five new collaborations have been established on campus and two off-campus partnerships have been initiated with groups at the Medical University of Vienna. These collaborations focus on the proteomic analysis of single cells derived from brain tissue, brain organoids, mouse oocytes, and placenta tissue , aiming to deepen our understanding of molecular pathways ranging from embryogenesis to age-related diseases . The platform has become a central hub for cutting-edge research in these areas, supporting both basic and translational science.

A major scientific milestone was the publication of a methodological study in Nature Methods (Bubis et al., 2025) , which showcases the platform’s capabilities and contributions to the field of single-cell proteomics. The study demonstrates how recent advances in mass spectrometry-particularly the Orbitrap Astral-combined with optimized sample preparation and liquid chromatography workflows, enable the quantification of approximately half of the expressed proteome in individual A549 lung cancer cells , which represents one of the most comprehensive proteomes from single cells seen so far. The study uncovered heterogeneity even within cultured and untreated, presumably homogenous, cells, depending on their cell cycle phase. The work highlights the importance of miniaturized sample handling made possible using the acquired cellenONE robot, high-sensitivity detection and unseen quantitative accuracy made possible with the acquired state of the art mass spectrometers and streamlined data acquisition in achieving deep proteome coverage at single-cell resolution. These innovations represent a significant leap forward in the field, transitioning single-cell proteomics from a niche capability to a

broadly applicable and reliable analytical tool.

Furthermore, with the publication of Müller et al 2025 we were able to show a significant improvement of crosslinked mass spectrometry by enhancing throughput and sensitivity. This led to the identification of more crosslinked peptides (40% more compared to the previous state-of-the-art instrument, the Orbitrap Eclipse), particularly those of low abundance, thus providing a much more comprehensive view of protein interactions and dynamics.

In summary, the project has achieved full implementation and exceeded expectations in terms of scientific output, collaboration, and infrastructure development. It has laid a strong foundation for future research and innovation in proteomics, with lasting impact on the local and international scientific community.

Projektpartner

- Vienna Biocenter Core Facilities GmbH