

## HighWay2Cell

The HIGH (Resolution) WAY To Cells – a platform for high resolution single cell omics

<b>Programm / Ausschreibung</b>	F&E Infrastruktur, F&E Infrastruktur, F&E Infrastrukturförderung 4. Ausschreibung 2022/01	<b>Status</b>	laufend
<b>Projektstart</b>	01.09.2023	<b>Projektende</b>	31.08.2026
<b>Zeitraum</b>	2023 - 2026	<b>Projektlaufzeit</b>	36 Monate
<b>Keywords</b>	high throughput analysis; single cell omics; spatial transcriptomics; imaging		

### Projektbeschreibung

Wir beantragen eine Hochdurchsatzplattform für die räumliche Analyse der RNA- und Proteinexpression in biologischen Proben auf Einzelzellniveau. Diese technologieübergreifende Plattform wird auch vorhandenes ergänzendes Know-how und Equipment (CyTOF, Massenspektrometer) in der Organisationseinheit Core Facilities nutzen. Die Plattform wird Bildgebung, Einzelmolekül-Hybridisierung und unterstützende Einzelzell-Proteomik-Technologie einschließen und damit die Analyse der räumlichen Protein- und Lipid-Expression auf subzellulärer Ebene in frisch gefrorenen sowie in in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten (FFPE) Geweben ermöglichen.

Neben der Anschaffung der dafür notwendigen Geräte wird in Zusammenarbeit mit dem IT Systems & Communications (ITSC) der Medizinischen Universität Wien ein High Performance Computing Cluster zur Datenanalyse implementiert werden. Für Forschungsprojekte in fast allen Bereichen der Biomedizin, insbesondere der personalisierten und der Präzisionsmedizin, besteht ein dringender Bedarf, die Genexpressionsmuster mit der Proteinexpression und ihrer jeweiligen Lokalisierung in einzelnen Zellen und in Geweben zu korrelieren. Mit diesem Wissen ist es möglich, den Einfluss der Mikroumgebung auf physiologische und pathologische Prozesse der Zellregulation besser einzuschätzen und beispielsweise degenerative Erkrankungen zu erkennen oder die Entwicklung von Tumoren auf subzellulärer Ebene zu untersuchen.

Die Plattform soll es Forscher:innen ermöglichen, die räumlichen Aspekte der Zelltypenheterogenität und Zell-Zell-Wechselwirkungen in erkrankten und gesunden Gewebeproben aufzuklären, indem sie das Vorhandensein einer Vielzahl von Proteinen und Lipiden und die Expression von Hunderten bis Tausenden von Genen mit subzellulärer Präzision ermöglicht. Leistungsstarke Computerressourcen sind notwendig um eine integrative Analyse der so gewonnenen Daten zu ermöglichen und damit Wissensgewinn aus diesen Experimenten zu maximieren.

Dazu planen wir die Anschaffung folgender Komponenten für eine solche Plattform:

Xenium-Analyzer in situ Single Cell Spatial Genomics Plattform

(<https://www.10xgenomics.com/instruments/xenium-analyzer/>):

Die Xenium Analyzer-Technologie von 10x Genomics ermöglicht eine in-situ Visualisierung und Quantifizierung der Genexpression in nativen wie auch Formalin-fixierten Gewebeschnitten auf Einzelzellniveau, welche zuvor auf einem

Xenium-Objektträger aufgebracht werden (1). Die Xenium-In-situ-Analyse verwendet zirkularisierbare Target-spezifische Sonden, welche nach Hybridisierung an Gewebs-RNA und PCR-Amplifikation mittels Fluoreszenzdetektion sichtbar gemacht werden. Der Xenium Analyzer detektiert und speichert die Position jeder fluoreszierenden Sonde im Gewebe in Form mikroskopischer Bilddaten. Mithilfe mehrerer aufeinanderfolgenden Runden von Fluoreszenzsonden-Hybridisierung entsteht eine einzigartige optische Signatur, die die Identität der RNA an einer Stelle in jeder Zelle eines Gewebes von bis zu ca. 1000 Genen ermöglicht. Die Plattform ist eine komplette End-to-End-Lösung, einschließlich eines robusten, vollautomatischen Instruments für die Hochdurchsatzanalyse. Der Xenium Analyzer verfügt über integrierte Analysefunktionen zur Verarbeitung von Bilddaten, zur Lokalisierung von RNA- und Proteinsignalen und zur Durchführung von Sekundäranalysen mit der von 10x Genomics bereitgestellten Software oder Tools von Drittanbietern.

#### Bildgebungsplattform MACSima™

([https://www.miltenyibiotec.com/AT-en/products/macs-imaging-and-microscopy/ultra-high-content-imaging.html?gclid=EAlaQobChMInerH-IS4-wlVTvIRCh0KYQd3EAAYAiAAEgJM6fD\\_BwE&countryRedirected=1](https://www.miltenyibiotec.com/AT-en/products/macs-imaging-and-microscopy/ultra-high-content-imaging.html?gclid=EAlaQobChMInerH-IS4-wlVTvIRCh0KYQd3EAAYAiAAEgJM6fD_BwE&countryRedirected=1)):

Die MACSima™ Imaging-Plattform ist die zur Zeit einzige angebotene Komplettlösung für Ultra-High-Content-Imaging-Experimente. Die Plattform inkludiert ein vollautomatisiertes Gerät auf Basis der Fluoreszenzmikroskopie. Die MICS-Technologie (MACSima™ Imaging Cyclic Staining) ermöglicht zusammen mit einem breiten Spektrum an rekombinanten, gebrauchsfertigen Antikörpern die Analyse von Hunderten von Markern auf einer einzigen Probe und von mehreren Proben gleichzeitig (2). Unseres Wissens ist diese Technologie noch nicht in Österreich erhältlich.

cellenONE® X1 Einzelzellen-Isolationsplattform (<https://www.cellenion.com/products/cellenone-x1/>):

cellenONE® X1 ist eine revolutionäre Plattform, die eine Einzelzellisolierung und -dispensierung in Echtzeit und mit hoher Genauigkeit, basierend auf der Pikoliter-Dispensierungstechnologie gekoppelt mit moderner Bildverarbeitung, ermöglicht. Die Analyse von Einzelzell-Proteomen mittels (Flüssigchromatographie-gekoppelter) Massenspektrometrie (MS bzw. LC-MS) ist äußerst relevant, um die Einzelzell-RNA-seq- oder Einzelzell-Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung zur Analyse der tatsächlichen Proteinexpression, sowie von Protein-Isoformen und translationalen Modifikationen zu erweitern. Unter Verwendung des SCoPE2-Ansatzes und der ProteoCHIP-Verbrauchsmaterialien einer neu entwickelten Well-Platte mit zwölf mal sechzehn Nanowells zur Verarbeitung von bis zu 192 Einzelzellen pro Chip wird Einzelzell-Proteomanalyse im Hochdurchsatz und mit hoher analytischer Sensitivität möglich (3). Der Arbeitsablauf benötigt keine manuellen Probenhandhabungsschritte, wodurch eine direkte Kopplung mit einem Standard-Autosampler ermöglicht wird, um die Peptidgewinnung für die während der gesamten Probenvorbereitung zu maximieren. Das Protokoll und Design des cellenONE® X1/proteoCHIP reduziert das Aufschlussvolumen drastisch, begrenzt chemisches Rauschen und erhöht die Effizienz der Einzelzellpräparation für die Proteomik.

#### IT Infrastruktur

Der High Performance Computing Cluster wird vom ITSC aufgebaut und hat unter anderem folgende technische Spezifikationen:

- Linux-Betriebssystem
- Die Hardware besteht aus einer Mischung aus CPU- und GPU-Knoten mit hoher Kernzahl und hoher Taktrate (min. NVIDIA

DGX A100).

- Slurm-Warteschlangensystem zum Senden von Jobs
- Hochleistungs-Netzwerk-Switches (InfiniBand) und Kabel für die Hochgeschwindigkeitskommunikation zwischen Knoten
- (lokaler) NVME-Speicher für schnellen Lese-/Schreibzugriff

Die neue Ressource soll an die bestehende High Performance Computing Infrastruktur (HPC-[GPU] Cluster) angeschlossen werden, die vom ITSC betrieben wird. Dieser Rechencluster schließt eine Lücke hinsichtlich universell zugänglicher und zentral verwalteter Rechenressourcen an der Medizinischen Universität Wien und macht die Medizinische Universität Wien fit für das Zeitalter von Big Data und digitaler und personalisierter Medizin. Diese Infrastruktur wird den Benutzer:innen der Organisationseinheit Core Facilities Zugang zu leistungsstarken Linux-Computern für die unabhängige nachgeschaltete Analyse von Experimenten einschließlich großer Genom-, Transkriptom-, Proteom- und Zytometrie-Datensätze, verschaffen, die in der Organisationseinheit Core Facilities durchgeführt werden. Gemeinsam mit dem ITSC bietet die Organisationseinheit Core Facilities hiermit eine Hochleistungs-Computing-Infrastruktur an, die allen Benutzer:innen der Core Facilities zur Analyse von Daten, die auf Instrumenten der Core Facilities generiert werden, und allen Forscher:innen an der Medizinischen Universität Wien zur Analyse großer Datenmengen zur Verfügung steht.

#### Literatur:

1. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.10.06.510405v2.full.pdf>
2. Kinkhabwala A, Herbel C, Pankratz J, Yushchenko DA, Rüberg S, Praveen P, Reiß S, Rodriguez FC, Schäfer D, Kollet J, Dittmer V, Martinez-Osuna M, Minnerup L, Reinhard C, Dzionek A, Rockel TD, Borbe S, Büscher M, Krieg J, Nederlof M, Jungblut M, Eckardt D, Hardt O, Dose C, Schumann E, Peters RP, Miltenyi S, Schmitz J, Müller W, Bosio A. MACSima imaging cyclic staining (MICS) technology reveals combinatorial target pairs for CAR T cell treatment of solid tumors. *Sci Rep.* 2022 Feb 3;12(1):1911. doi: 10.1038/s41598-022-05841-4. PMID: 35115587; PMCID: PMC8813936.
3. Petelski AA, Emmott E, Leduc A, Huffman RG, Specht H, Perlman DH, Slavov N. Multiplexed single-cell proteomics using SCoPE2. *Nat Protoc.* 2021 Dec;16(12):5398-5425. doi: 10.1038/s41596-021-00616-z. Epub 2021 Oct 29. PMID: 34716448; PMCID: PMC8643348.

#### **Abstract**

We propose to establish a high throughput platform for spatially resolved profiling of single cells in biological samples. This platform will be overarching and will also make use of existing complementing expertise and equipment (CyTOF, mass spectrometers) in the Organisational Unit Core Facilities. It will comprise imaging, single-molecule hybridization and support single-cell proteomics technology, which will allow analysis of spatial protein and lipid expression on a subcellular level in fresh frozen as well as FFPE tissues.

Along with the instruments, a high performance computing cluster for data analysis will be implemented in collaboration with IT Systems & Communications (ITSC) of the Medical University of Vienna.

For research projects in almost all areas of biomedicine, especially personalized and precision medicine, there is an urgent need to correlate the type of genes expressed with protein expression and their respective localization in cells and tissues. With this knowledge, it is possible to better assess the influence of the micro-environment on physiological and pathological processes of cell regulation and, for example, to identify degenerative diseases or to study the development of tumors at subcellular levels.

The platform would enable researchers to elucidate the spatial aspects of cell type heterogeneity and cell-cell interactions in

diseased and healthy tissue samples by revealing the presence of a multitude of proteins and lipids and the expression of hundreds to thousands of genes with subcellular precision. Powerful computing resources will allow for integrative analysis of the resulting data, thus maximizing the knowledge return from the experiments. To that end we plan to acquire the following components for such a platform:

Xenium Analyzer in situ single cell spatial genomics platform (<https://www.10xgenomics.com/instruments/xenium-analyzer/>):

The Xenium Analyzer technology from 10x Genomics allows to visualize, quantify, and analyze gene expression and protein abundance in Fresh Frozen (FF) and FFPE-preserved tissue sections immobilized onto a Xenium slide (1). Xenium in situ analysis uses circularizable probes specific to target transcripts followed by enzymatic amplification to create a target for fluorescent probe hybridization. On the Xenium Analyzer, microscope images of the tissue detect the location of each fluorescent probe, which is then removed. Successive rounds of fluorescent probe hybridization, imaging, and removal creates a unique optical signature that reveals the identity of the RNA at a location within each cell of a tissue from a few hundred to ~1,000 genes. The platform is a complete end-to-end solution, including a robust, fully automated instrument for high-throughput analysis. The Xenium Analyzer comes with onboard analysis capabilities to process image data, localize RNA and protein signals, and perform secondary analysis with 10x Genomics-provided software or third-party tools. To our knowledge this technology is not yet available in Austria.

MACSima™ imaging platform

([https://www.miltenyibiotec.com/AT-en/products/macs-imaging-and-microscopy/ultra-high-content-imaging.html?gclid=EAlaIobChMInerH-IS4-wlVTvIRCh0KYQd3EAAYAiAAEgJM6fD\\_BwE&countryRedirected=1](https://www.miltenyibiotec.com/AT-en/products/macs-imaging-and-microscopy/ultra-high-content-imaging.html?gclid=EAlaIobChMInerH-IS4-wlVTvIRCh0KYQd3EAAYAiAAEgJM6fD_BwE&countryRedirected=1)):

The MACSima™ imaging platform is the only complete solution for ultra-high content imaging experiments. It includes a fully automated instrument based on fluorescence microscopy. Its MICS (MACSima™ Imaging Cyclic Staining) technology, together with a broad spectrum of recombinant ready-to-use antibodies, allows the analysis of hundreds of markers on a single sample and multiple samples at a time (2). To our knowledge this technology is not yet available in Austria.

cellenONE® X1 single cell isolation platform (<https://www.cellenion.com/products/cellenone-x1/>):

cellenONE® X1 is a revolutionary platform that provides real-time and high accuracy single cell isolation and dispensing, based on picolitre-dispensing technology and coupled with advanced image processing. The analysis of single cell proteomes using (LC-)MS is highly relevant to expand single cell RNA-seq or smFISH for analysis of actual protein expression, protein isoforms and post-translational modifications. Using the SCoPE2 approach and the ProteoCHIP consumables a newly developed well-plate containing twelve times sixteen nanowells for processing up to 192 single cells per chip single-cell proteomic analysis in high throughput and sensitivity becomes possible (3). The workflow overcomes all manual sample handling steps and allows direct interfacing with a standard autosampler to maximize peptide recovery throughout the sample preparation. The protocol and design of the cellenONE® X1/proteoCHIP drastically reduces digest volumes, limits chemical noise, and increases the efficiency of the single-cell preparation for proteomics.

IT infrastructure:

The high performance computing cluster will be set up by the ITSC and will have among others the following technical

specifications:

- Linux operating system
- the hardware consists of a mix of high core and high clock speed CPU and GPU (min. NVIDIA DGX A100) nodes
- a slurm queue system to submit jobs
- high performance (InfiniBand) network switches and cables for high speed communication between nodes
- (local) NVME storage for fast read/write access

The new resource shall be connected to the existing high performance computing infrastructure (HPC-[GPU] cluster) operated by the ITSC. This computing cluster will fill a gap regarding universally accessible and centrally administered computing resources at the Medical University of Vienna, and will make the Medical University of Vienna fit for the age of Big Data and digital and personalized medicine. This infrastructure would enable the Organisational Unit Core Facilities, to provide to our users access to powerful Linux computers for independent downstream analysis of experiments performed at the Core Facilities, including large genome, transcriptome, proteome and cytometry data sets. Together with the ITSC, the Organisational Unit Core Facilities hereby allocates a high performance computing infrastructure which will be available for all users of the Core Facilities to analyze data generated on instruments of the Core Facilities, and to everyone at the Medical University of Vienna analyzing large amounts of data of any provenience.

References:

1. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.10.06.510405v2.full.pdf>
2. Kinkhabwala A, Herbel C, Pankratz J, Yushchenko DA, Rüberg S, Praveen P, Reiß S, Rodriguez FC, Schäfer D, Kollet J, Dittmer V, Martinez-Osuna M, Minnerup L, Reinhard C, Dzionek A, Rockel TD, Borbe S, Büscher M, Krieg J, Nederlof M, Jungblut M, Eckardt D, Hardt O, Dose C, Schumann E, Peters RP, Miltenyi S, Schmitz J, Müller W, Bosio A. MACSima imaging cyclic staining (MICS) technology reveals combinatorial target pairs for CAR T cell treatment of solid tumors. *Sci Rep.* 2022 Feb 3;12(1):1911. doi: 10.1038/s41598-022-05841-4. PMID: 35115587; PMCID: PMC8813936.
3. Petelski AA, Emmott E, Leduc A, Huffman RG, Specht H, Perlman DH, Slavov N. Multiplexed single-cell proteomics using SCoPE2. *Nat Protoc.* 2021 Dec;16(12):5398-5425. doi: 10.1038/s41596-021-00616-z. Epub 2021 Oct 29. PMID: 34716448; PMCID: PMC8643348.

## Projektpartner

- Medizinische Universität Wien