



Doctoral Thesis

Electrochemical DNA hybridization sensor and axonal channel device implemented on CMOS microelectrode arrays

Author(s):

Lewandowska, Marta K.

Publication Date:

2014

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010419283> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 22436

***Electrochemical DNA hybridization sensor
and
axonal channel device
implemented on CMOS microelectrode arrays***

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZÜRICH

(Dr. sc. ETH Zürich)

presented by

Marta Karolina Lewandowska

M.A. Physics, Boston University, USA

born on 20.06.1979

citizen of Poland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Andreas Hierlemann

Prof. Dr. Stéphanie Lacour

Prof. Dr. Ulrich Egert

2014

Abstract

The application of microelectronic and microfabrication tools to biology has opened vast new fields of study. While the interface between cells or biomolecules, and electrodes remains challenging, the opportunities for making interesting, and important contributions propel us to confront these challenges and make new discoveries.

This thesis describes the implementation of two different bio-electrochemical interfaces onto two different CMOS microelectrode array chips. The first implementation is an electrochemical label-free DNA hybridization sensor on a 576-electrode array chip capable of doing three-electrode electrochemical measurements, which was intended as a point-of-care device. The second implementation is an axonal isolation device made of polydimethylsiloxane (PDMS), which guides the growth and amplifies the signals of neuronal processes growing along the surface of an 11,011-electrode array capable of reading out extracellular action potentials with subcellular resolution. Both chips were designed in our group.

The DNA hybridization sensor was based on immobilization chemistry developed by collaborators, and involved a four-step electrochemical deposition process in order to attach single stranded DNA oligonucleotides to the chip electrodes. Pyrrole was electropolymerized onto the electrode, to create the conducting polymer polypyrrole, which served as the transducer for the sensing event. A novel polymer, TPTC11-PO₃, was developed as a linker, and was electropolymerized onto the polypyrrole. Mg²⁺ ions were then electrostatically attached to the phosphate groups on the TPTC11-PO₃, and formed the bond between the polymer and single stranded DNA molecules. Cyclic voltammetry was used to detect the presence or absence of hybridization. The excess negative charge associated with double stranded DNA modulated the movement of negatively charged ions in the electrolyte into and out of the polypyrrole, thus causing a decrease in the measured current, compared to single stranded DNA.

The CMOS chip, so-called the DNACHIP, featured 24x24 working electrodes that could be connected, column by column, to 24 potentiostatic readout circuits that digitized the current while keeping the electrodes at a fixed voltage, as well as on-chip counter and reference electrodes. Two thirds of the digitization circuits were sigma-delta converters, which utilized the electrode-electrolyte interface as a circuit element. Connected to a small field programmable gate array, used for chip control, and powered by a laptop via its USB connection, the entire system was compact and mobile.

Adaptation and transfer of the electrochemical immobilization and detection techniques onto the DNACHIP was challenging for a variety of reasons. The method of packaging the chip to protect circuitry from fluids proved incompatible with electrochemical measurements and had to be modified. Controlled electropolymerization of conducting and non-conducting polymers was not reproducible, adhesion of deposited layers was not robust, and polymerized layers were not electrically stable over time. The complexity of the system made it difficult to troubleshoot. New packaging schemes as well as passive chips that required an external potentiostat were developed, and these enabled some successful measurements to be made.

The PDMS axonal isolation device was designed to guide the growth of axons and amplify the propagating signals, thus enabling readout of single spikes with high signal to noise. Devices were designed to be compatible with the HiDens chip, a high-density microelectrode array featuring 11,011 electrodes, spaced at a 17 μm pitch, that enabled readout of subcellular signals from electrogenic cells, such as neurons. Featuring a switch matrix underneath the electrode array, the 126 readout channels could be reconfigured in 1.4 ms so that any electrode on the array could be read out or stimulated, while maintaining very low noise levels.

Several different designs were created for the PDMS device, all of which comprised two chambers for cell culture and long, thin channels in between into which only neuronal processes could grow. Chamber size and channel width and length were varied. An efficient method of bonding the PDMS piece to the HiDens chip was developed, as was a new packaging scheme using PDMS to passivate the electronics from the cells and culture medium. Embryonic rat neurons were plated into culture chambers so their axons could grow through the 500 – 950 μm structures. The cells in the two culture chambers formed networks that communicated synaptically with one another through the channels. Somas could

be correlated with their axons using both spontaneous spiking as well as stimulation near the soma via the multielectrode array.

Distinct complex spike shapes were observed in channels, which could be attributed to individual cells. A main merit of these isolated and aligned axons was the reproducible recordings of large characteristic spikes. In the short term even complicated shapes were highly consistent, while in the long term the changing patterns could be attributed to maturation of the culture. Axonal branching was responsible for the complex spike shapes. Linear superposition of two spike shapes that resulted from the stimulation of two different cells was shown to reproduce the expected complex spike. Even though many axons grew into a single channel, their signals could be resolved and assigned to individual cells, whose somas lay outside of channels.

Stimulation of neurons at various frequencies ranging from 10 Hz to 160 Hz showed that axons modulate action potential propagation as stimulation frequency and the number of stimulations increased. All neurons that were stimulated showed the same type of response: spike size decreased, spike width increased, and latency increased as propagation slowed down. These effects were dramatic, resulting in spike heights that were a fraction of their original size, and sometimes resulted in propagation failures along the axon. The frequency at which the effects became significant varied across the cohort of cells that was studied, and may be related to the spontaneous spiking characteristics of the cell. Some effects were seen along multiple axonal branches belonging to a cell, while other effects were differential, manifesting differently along one branch than the other. Experiments performed in medium with different ion concentrations demonstrated the dependence of propagation on potassium concentration: lower concentrations caused failures to occur earlier and at lower frequencies while higher concentrations enabled propagation at higher frequencies.

The implementation of the axonal channel device on the HiDens chip proved to be a successful method to study the properties of axons. The device is well-suited to studying axonal information processing and ephaptic coupling as well as isolated synaptic interactions between specific cell types.

Zusammenfassung

Die Verwendung mikroelektronischer Sensoren und Techniken der Mikrofabrikation in der biologischen Forschung hat zahlreiche neue Forschungsfelder eröffnet. Auch wenn die Kombination von biologischen Materialien wie Zellen, Proteinen und DNA mit elektronischen Bauteilen eine große Herausforderung darstellt, bieten dieses Gebiet die Möglichkeit, neue, interessante und wichtige Entdeckungen zu machen.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Entwicklung zweier bio-elektrochemischer Sensoroberflächen und deren Verwendung auf zwei unterschiedlichen CMOS-Mikroelektrodenarraychips. Im ersten Teil beschreibe ich einen elektrochemischen DNA-Hybridisierungssensor zur markierungsfreien Detektion von DNA. Der Sensor umfasst ein Array mit 576 Elektroden und wurde als „Point of Care“-Gerät entworfen. Im zweiten Teil der Arbeit beschreibe ich eine Mikrosensorstruktur zur Verstärkung extrazellulär abgeleiteter Signale von Neuronen. Die Struktur besteht aus Polydimethylsiloxan (PDMS) und ermöglicht die Isolation und ein gerichtetes Wachstum von Axonen auf einem Elektrodenarray mit 11011 Elektroden, welche die Messung von Aktionspotentialen mit subzellulärer Auflösung ermöglichen. Beide Chips wurden in unserem Labor entwickelt.

Der DNA-Hybridisierungssensor basiert auf der elektrochemischen Immobilisation einzelsträngiger DNA-Oligonukleotide auf den Elektroden des Chips. Die Immobilisationsmethode umfasst einen vierstufigen elektrochemischen Abscheidungsprozess, welcher von einem Partnerlabor entwickelt wurde. In der ersten Stufe wird Pyrrol durch Elektropolymerisation als leitfähige Polypyrrolschicht auf den Elektroden abgeschieden. Diese Schicht dient der Übertragung des detektierten Signals an die Elektroden. In der zweiten Stufe wird ein neuartiges Polymer, TPTC11-PO₃, durch Elektropolymerisation auf der Polypyrrolschicht abgeschieden. TPTC11-PO₃ dient als Adaptermolekül zwischen der Polypyrrolschicht und den einzelsträngigen DNA-Oligonukleotiden. Die elektrostatische Bindung von Magnesiumionen an die Phosphatgruppe von TPTC11-PO₃ in der dritten Stufe des Immobilisationsprozesses ermöglicht die Immobilisation einzelsträngiger DNA-Moleküle auf der Sensoroberfläche. Zur Detektion von Hybridisierungsvorgängen zwischen Proben-DNA-Molekülen auf der Sensoroberfläche und DNA-Molekülen in der Analytlösung wird zyklische Voltametrie verwendet. Die Bildung eines doppelsträngigen DNA-Moleküls führt zu einer erhöhten Konzentration negativer Ladungen auf der Sensoroberfläche, welche die Verteilung mobiler Ladungen in der Polypyrrolschicht verändert. Die Hybridisierung eines DNA-Doppelstranges auf dem Sensor führt dann zu einer Verringerung des zu messenden Stroms an der Elektrode.

Der sogenannte „DNA-Chip“ besitzt 24x24 Messelektroden, welche spaltenweise mit 24 Schaltkreisen zur potentiostatischen Auslesung verbunden werden können. Die Schaltkreise zur potentiostatischen Auslesung digitalisieren den Messstrom und halten die Messelektroden gleichzeitig auf konstantem Potential. Des weiteren besitzt der Chip eine Gegenelektrode und mehrere Referenzelektroden. Die Schaltkreise zur Digitalisierung des Messstromes bestehen zu zwei Dritteln aus Sigma-Delta-Konvertern, welche die Elektrode-Elektrolyt-Grenzfläche als Schaltmodul nutzen. Durch die Verwendung eines USB-betriebenen Field Programmable Gate Arrays zur Steuerung des Chips ist das Messsystem kompakt und mobil.

Die Verwendung elektrochemischer Immobilisations- und Detektionsmethoden in Verbindung mit dem „DNA-Chip“ war in mehrerer Hinsicht eine Herausforderung. Die Methode für das Chip Packaging erwies sich als inkompatibel mit elektrochemischen Messungen und musste modifiziert werden. Die kontrollierte Elektropolymerisation von leitfähigen und nicht-leitfähigen Polymeren auf der Elektrode war nicht möglich. Die Adhäsion der abgeschiedenen Schichten erwies sich als nicht ausreichend, und die elektrische Stabilität der Polymere war nicht gegeben. Durch die Komplexität des Systems wurde die Fehlersuche schwierig. Durch die Verwendung neuer „Chip Packaging“-Protokolle, passiver Chips und externer Potentiostaten wurden erfolgreiche Messungen möglich.

Die PDMS Mikrotunnelstruktur wurde entworfen um das Auswachsen von Axonen zu steuern und deren extrazelluläre elektrische Signale zu verstärken. Die Struktur wurde kompatibel mit dem HiDens Mikrochip konzipiert und ermöglichte, einzelne Spikes mit hohem Signal-Rausch-Verhältnis aufzunehmen.

Der HiDens Mikrochip hat eine sehr dichte Mikroelektrodenanordnung von 11.011 Elektroden im Abstand von 17 μm , die das Auslesen subzellulärer Signale von elektrogenen Zellen wie Neuronen ermöglicht. Eine Schaltmatrix unter der Elektrodenanordnung ermöglicht die Rekonfiguration der 126 Auslesekanäle innerhalb von 1.4 ms, sodass jede beliebige Elektrode bei sehr geringen Störsignalpegeln ausgelesen oder stimuliert werden kann.

Mehrere verschiedene Entwürfe der PDMS Mikrotunnelstruktur wurden realisiert. Alle beinhalteten zwei Kammern für Zellkulturen, die mit lange dünnen Kanälen, in die nur neuronale Fortsätze wachsen konnten, verbunden waren. Kammergröße, Kanalbreite und -länge wurden variiert. Es wurden Methoden zur Verbesserung der Adhäsion der PDMS Strukturen auf dem HiDens Mikrochip sowie zum Schutz der Elektronik gegen Zellen und Zellkulturmedium entwickelt. Embryonale Rattenneuronen wurden in die Kammern ausplattiert, Axone und Dendriten wuchsen in die Kanäle, aber nur Axone wuchsen komplett durch die 500–900 μm langen Strukturen. Die Zellen in den zwei Kulturkammern bildeten Netzwerke, die durch die Kanäle synaptisch miteinander kommunizierten. Die Somata konnten durch spontanes Feuern sowie durch Stimulation in der Nähe der Somata mit Hilfe der Mikroelektrodenanordnung mit den entsprechenden Axonen korreliert werden.

In den Kanälen wurden komplexe Signalformen beobachtet, die einzelnen Zellen zugeordnet werden konnten. Ein grosser Vorteil der Tunnelstruktur waren die charakteristisch grossen Signalamplituden. In kurzen Zeiträumen wurden auch gleichbleibend komplexe Signalformen beobachtet, während die Änderung der Signalformen über längere Zeiträume auf das Altern der Zellkultur zurückgeführt werden konnte. Der Grund für die komplexen Signalformen waren axonale Verzweigungen in den Tunneln. Es konnte gezeigt werden, dass die lineare Überlagerung zweier einfacher Signalformen komplexere Signalformen zur Folge hatte, die dann auch durch die Stimulation mehrerer Zellen hervorgerufen werden konnten. Obwohl mehrere Axone in einen einzelnen Kanal wuchsen, konnten ihre Signale aufgelöst und einzelnen Zellen, deren Somata ausserhalb des Kanals lagen, zugeordnet werden.

Stimulation von Neuronen bei verschiedenen Frequenzen von 10 – 160 Hz zeigte, dass axonale Aktionspotentialausbreitung mit steigender Stimulationsfrequenz und Anzahl von Stimulationen variiert. Alle stimulierten Neuronen zeigten ähnliches Verhalten: Die Spikeshöhe nahm ab, die Spikeweite und die Latenz nahmen zu, während die Signalausbreitung langsamer wurde. Diese Effekte waren drastisch, Spikeshöhen waren nur noch ein Bruchteil der ursprünglichen Höhen und teilweise kam es zu Ausbreitungsstörungen entlang der Axone. In den untersuchten Zellen war die Frequenz unterschiedlich, bei der die Effekte signifikant wurden. Die Effekte konnten entlang axonaler Zweige verschiedener oder sogar derselben Zelle beobachtet werden. Die Abhängigkeit der Signalausbreitung von der Kaliumkonzentration wurde in Experimenten mit Medien verschiedener Ionenkonzentrationen nachgewiesen: Geringere Konzentrationen ermöglichten auch eine Ausbreitung bei höheren Frequenzen.

Es zeigte sich, dass die Verwendung einer Mikrotunnelstruktur auf dem HiDens Chip eine vielversprechende Methode zur Untersuchung von Axoneigenschaften ist. Die Struktur ist gut geeignet, axonale Informationsverarbeitung und ephatische Kopplungen sowie isolierte synaptische Interaktionen zwischen spezifischen Zelltypen zu untersuchen.