



Dissertation

Wireless Impedance-Monitoring of Adherent Cell-Cultures

ausgeführt zum Zwecke der Erlangung des
akademischen Grades eines Doktors der
technischen Wissenschaften unter der Leitung von

Prof. Dr. Michael J. Vellekoop

eingereicht an der Technischen Universität Wien
Fakultät für Elektrotechnik und Informationstechnik

von

DI Jürgen Markus Wissenwasser

Brandjochstraße 4B, 6020 Innsbruck
Matr-Nr. 0026169

Innsbruck, im Juni 2012

Erstbegutachter

Prof. Dr. Michael J. Vellekoop
Universität Bremen
Bremen, Deutschland

Zweitbegutachter

Univ. Doz. Mag. Dr. Anton Köck
Austrian Institute of Technology
Wien, Österreich

Schriftenreihe des Instituts für Sensor- und Aktuatorssysteme
Technische Universität Wien

Jürgen Wissenwasser

**Wireless Impedance-Monitoring
of Adherent Cell-Cultures**

Shaker Verlag
Aachen 2012

Bibliographic information published by the Deutsche Nationalbibliothek

The Deutsche Nationalbibliothek lists this publication in the Deutsche Nationalbibliografie; detailed bibliographic data are available in the Internet at <http://dnb.d-nb.de>.

Zugl.: Wien, TU, Diss., 2012

Copyright Shaker Verlag 2012

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without the prior permission of the publishers.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-1218-7

ISSN 1866-1181

Shaker Verlag GmbH • P.O. BOX 101818 • D-52018 Aachen

Phone: 0049/2407/9596-0 • Telefax: 0049/2407/9596-9

Internet: www.shaker.de • e-mail: info@shaker.de

KURZFASSUNG

Diese Arbeit behandelt elektrische Impedanzmessung an adhärenenten biologischen Zellkulturen. Der variable Bedeckungsgrad (Konfluenz) von Elektrodenflächen durch adhärenente Zellen geht mit einer Änderung der elektrischen Impedanz gegenüber der Nährlösung einher. Die Konfluenz vergrößert sich beispielsweise aufgrund von Zellwachstum oder verringert sich durch Seneszenz oder äußere toxische Einflüsse. Eine weitere Quelle für Impedanzänderung sind die Veränderung der Zellen selbst, wie hier bei der induzierten Differenzierung von Stammzellen beobachtet werden konnte.

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Sensoren basieren auf Glaschips mit definierten metallischen Elektrodenstrukturen, die in direktem Kontakt mit dem Nährmedium bzw. den Zellen stehen. Ein darauf aufbauendes modulares Sensorsystem erlaubt die Reinigung und Wiederverwendung der eingesetzten Chips. Um Anwendern in der Zellkulturtechnik möglichst große Flexibilität zu geben, war der Einsatz einer drahtlosen Messtechnik gefordert. Hierbei wurde großer Wert auf die Kompatibilität zu bestehenden Zellkulturwerkzeugen und –materialien gelegt, sodass konventionelle 6-well Microtiter-Platten als Basis und Kontaminationsschutz gewählt wurden.

Der drahtlose Ansatz zur Messtechnik kommt ohne Akkus bzw. Batterien aus und basiert auf einem patentierten Ablauf. Hierbei wird aus dem für die drahtlose Kommunikation erforderlichen Hochfrequenz-Feld, in Anlehnung an die Radio Frequency Identification (RFID) Technologie, Energie gewonnen.

Die Sensoren selbst arbeiten im Frequenzbereich von 5 bis 50 kHz, wobei die meisten hier präsentierten Untersuchungen bei 10 kHz durchgeführt wurden. Die Elektronik der Sensorschnittstelle wurde besonders energieeffizient dimensioniert.

Messungen an 3T3 Mausembryo-Fibroblasten, wie auch an menschlichen mesenchymalen Stammzellen, wurden in Kurzzeit- (bis zu 3 Tage) und Langzeitversuchen (bis zu 4 Wochen) ausgeführt. Bei den Fibroblasten konnte das Meßsystem zur Bewertung des Wachstumsverhaltens und der Terminierung durch hochtoxische Substanzen eingesetzt werden. Dabei wurde auch ein starker Einfluss der Inkubatoratmosphäre auf die Messergebnisse erkannt, insbesondere durch den Verlust von Nährmedium durch Verdunstung.

Die mesenchymalen Stammzellen wurden einer osteogenen und adipogenen Differenzierung unterworfen. Die dabei gewonnenen Daten zeigen, dass charakteristische Impedanzänderungen bereits binnen 24 Stunden nach der induzierten Differenzierung erkennbar sind, wogegen konventionelle Färbemethoden erst nach 5 bis 7 Tagen zuverlässige Ergebnisse liefern.

SUMMARY

This work concerns electrical impedance measurements on adherent biological cell cultures. The variable coverage (confluence) of electrode structures by adherent cells alters the electrical impedance with respect to the cell culture medium. Confluence increases e.g. by cell growth or decreases by senescence or external toxic influences. Another source for impedance variation is the change of the cells, e.g. by induced differentiation of stem cells.

The invented sensor is based on glass chips carrying electrode structures which are in direct contact with the cells and the culture medium. The introduction of a modular sensor system allows cleaning and reuse of the sensor chips. A maximum of flexibility for the operators in the cell culture laboratory is achieved by the implementation of wireless technique, where one constraint was the compatibility to established cell culture tools and materials. Thus, conventional 6-well microtiter-plates were chosen for both, as a rack and as contamination protection unit.

The wireless approach does not rely on batteries and is based on a patented energy storage procedure. There, energy is taken from the radio frequency-field which is present in wireless communication. The technique relies on Radio Frequency Identification (RFID) technology.

The sensors are operated in a frequency range between 5 and 50 kHz, most investigations were performed at 10 kHz. The presented electronic readout system was specially invented for high energy efficiency because commercially available systems exceeded power constraints.

Measurements on 3T3 embryonic mouse fibroblasts, as well as on human mesenchymal stem cells, were performed in short-term (up to 3 days) and long-term-measurements (up to 4 weeks). The monitoring of fibroblasts was used to examine cell growth behavior and the influence of highly toxic substances on the electrical impedance. There, also a strong influence of the incubator atmosphere on the measurements was found, which is caused by the loss of culture medium due to evaporation.

Osteogenic and adipogenic differentiation was induced to the mesenchymal stem cells. The results show that characteristic impedance changes were found within 24 hours, while conventional staining methods show reliable results only after 5 to 7 days of culture time.

CONTENTS

KURZFASSUNG	I
SUMMARY	III
NOMENCLATURE	IX
INTRODUCTION	1
1.1. CURRENT MEASUREMENT METHODS ON CELL CULTURES	2
1.2. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	6
1.3. IMPEDANCE MEASUREMENT AS A TOOL IN MICROBIOLOGY	6
1.4. THESIS OUTLINE	7
1.5. BIBLIOGRAPHY	8
CELL BIOLOGY AND LABORATORY ENVIRONMENT	11
2.1. STRUCTURE OF A CELL	11
2.2. IN VITRO CELL CULTURES	13
2.3. LABORATORY EQUIPMENT	17
2.4. BIBLIOGRAPHY	20
IMPEDANCE SENSING ON CELLS	23
3.1. ELECTRICAL PROPERTIES OF CELLS AND CULTURE MEDIUM	23
3.2. ELECTRODE STRUCTURES	26
3.3. INTERDIGITATED ELECTRODE STRUCTURE AS SENSOR	29
3.4. SENSOR DEVICE CONSTRUCTION	30
3.5. SENSOR CHARACTERIZATION	38
3.6. DISCUSSION	43
3.7. BIBLIOGRAPHY	44
MEASUREMENT SETUP	49
4.1. RF INTERFACE	50
4.2. MEASUREMENT ELECTRONICS	58
4.3. TAG DESIGN AND PACKAGING	68
4.4. REALIZED SYSTEM	72
4.5. DISCUSSION	74
4.6. BIBLIOGRAPHY	75
EXPERIMENTAL RESULTS	79
5.1. SYSTEM TESTS AND PREPARATIONS	79
5.2. 3T3 MOUSE EMBRYONIC FIBROBLASTS	83
5.3. HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS	92

5.4.	DISCUSSION	103
5.5.	BIBLIOGRAPHY	105
OUTLOOK		109
6.1.	DESIGN PROPOSAL	109
6.2.	A MONITORING TECHNIQUE FOR THE INCUBATOR	110
6.3.	IMPEDANCE MEASUREMENT: A FEASIBLE STANDARD ASSESSMENT TECHNIQUE?	111
6.4.	BIBLIOGRAPHY	112
DANKSAGUNG		117
ACKNOWLEDGEMENTS		119
LIST OF PUBLICATIONS		121
ÜBER DEN AUTOR		123
ABOUT THE AUTHOR		125

NOMENCLATURE

List of Abbreviations

Abbreviation	Description
AC	Alternating Current
ADC	Analog-to-Digital-Converter
AIT	Austrian Institute of Technology
ASK	Amplitude Shift Keying
CAM	Cell Adhesion Molecule
CESSEC	Cell Sensor Electronics Control, PC control software of the invented measurement system
CRC	Cycling Redundancy Chechsum
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dBc	Dezi-Bel unit in which the reference value is a carrier signal.
DC	Direct Current
DFT	Discrete Fourier Analysis
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Deoxyribonucleic acid
DUT	Device Under Test
E. coli	Escherichia Coli (bacteria species)
ECIS™	Electric Cell Substrate Impedance Sensing, a trademark of Applied Biophysics
ECM	Extracellular Matrix
EDTA	Trypsin-Ethylenediaminetetraacetic-Acid
EtOH	Ethanol
FBS	Fetal Bovine Serum, also called FCS.
FCS	Fetal Calf Serum, also called FBS.
GBW	Gain-Bandwidth (Product)
GCP	Good Clinical Practice
GFP	Green Fluorescent Protein
GLP	Good Laboratory Practice
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
hMSC	Human Mesenchymal Stem Cells
IC	Integrated Circuit(s)
IDES	Interdigitated/Interdigital Electrode Structure(s)
ISO	International Organization for Standardization
ITU	International Telecommunication Union

Abbreviation	Description
I/O	Input/Output (of a digital system)
LOR	Lift-Off Resist
LTCC	Low Temperature Co-firing Ceramics
MEM	Minimum Essential Medium
MSC	Mesenchymal Stem Cell
NHDF	Normal Human Dermal Fibroblast (cell line)
NRU	Neutral Red Uptake
OA	Operational Amplifier
ÖAW	Österreichische Akademie der Wissenschaften (Austrian Academy of Sciences)
OECD	Organization for Economical Co-operation and Development
PBS	Phosphate Buffered Saline Solution
PC	Personal Computer
PCB	Printed Circuit Board
PDMS	Polydimethylsiloxane
PIC	Programmable Interrupt Controller, a microcontroller family of <i>Microchip</i>
PTFE	Polytetrafluorethylene
RF	Radio Frequency
RFID	Radio Frequency Identification
RMS	Root Mean Square
RNA	Ribonucleic Acid
UPILEX®	Trademark of a polyimide produced by <i>UBE</i>
UV	Ultraviolet
μC	Microcontroller

List of Constants

Symbol	Description	Value	Unit
ϵ_0	Absolute permittivity	$8.85419 \cdot 10^{-12}$	A s (V m) ⁻¹
μ_0	Magnetic permeability	$1.25664 \cdot 10^{-6}$	V s (A m) ⁻¹
π	Ludolph's number	3.14159	–
F	Faraday constant	$9.64853 \cdot 10^4$	A s mol ⁻¹
R	Gas constant	8.31446	J (mol K) ⁻¹

List of Variables

This is not a complete list but an overview of the most important variables.

Symbol	Description	Unit
c_x	Concentration of a certain species x of an electrolyte	mol m^{-3}
C_D	Capacity of the diffusion layer of an electrolyte	F
C_{DL}	Capacity of an electrochemical double layer	F
C_S	Capacity of the idealized polarizable electrode	F
D	Diffusion constant of a certain substance	$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$
f_0	Base frequency, e.g. 13.56 MHz of the RFID-system	Hz
f_C	Clock frequency of a microcontroller. $f_C = 1/T_C$	Hz
f_{sc}	Subcarrier frequency. 250 kHz for the presented RFID-system	Hz
f_X	Frequency of a certain probe signal. $f_X = 1/T_X$.	Hz
G	Gap distance between two adjacent fingers of an IDES	m
K_W	Frequency-independent factor of the Warburg-impedance	$\Omega \text{m}^2 \text{s}^{-1}$
L_1, L_2	Coil inductance of base station and tag, respectively.	H
n	Electrode reaction valence	-
R_t	Charge transfer resistance	Ω
T_C	Clock period of a microcontroller. $T_C = 1/f_C$.	s
T_X	Period of a certain probe signal. $T_X = 1/f_X$.	s
V_{pp}	Peak-to-peak value of a sinusoidal waveform	V
W	Width of a finger of an IDES	m
ε_r	Relative permittivity of a certain substance	-
A	Limiting conductivity of a certain substance	$\text{S m}^2 \text{mol}^{-1}$
λ	Finger-period $G + W$ of an IDES	m
σ	Electrical conductivity of a certain substance	S m^{-1}
ω	Circular frequency	s^{-1}