
REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT

Noi strategii analitice ce adresează probleme de sănătate publică: aptamerii și utilizarea lor în senzori electrochimici

Doctorand: **Magdolna CASIAN**

Conducători de doctorat: **Prof. Dr. Cecilia CRISTEA**

Prof. Dr. Noemí DE-LOS-SANTOS-ÁLVAREZ



Universidad de Oviedo



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINSUL TEZEI DE DOCTORAT

INTRODUCERE.....	1
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII.....	3
1. Probleme de sănătate publică.....	5
1.1. Infecții bacteriene și rezistența la antibiotice	5
1.2. Afecțiuni canceroase.....	7
1.3. Siguranța alimentară.....	8
2. Aptameri și tehnologia SELEX.....	9
2.1. Teoria SELEX.....	9
2.2. Mecanismul de interacțiune aptamer-țintă.....	10
2.3. Evoluția strategiilor SELEX.....	12
2.3.1. Molecule țintă imobilizate pe suport solid	12
2.3.2. Aptameri imobilizați pe suport solid	13
2.3.3. Aptameri și molecule țintă liberi în soluție	13
2.3.4. Strategii pentru aplicații <i>in vivo</i>	14
2.4. Optimizări post-SELEX	16
2.5. Caracterizarea aptamerilor	17
2.5.1. Caracterizarea echilibrului de reacție și a parametrilor termodinamici.....	17
2.5.2. Tehnici de evaluare a afinității.....	18
3. Biosenzori electrochimici ca instrumente pentru probleme de sănătate publică.....	21
3.1. Fundamente teoretice ale biosenzorilor	21
3.2. Elemente de biorecunoaștere.....	22
3.3. Aptasenzori electrochimici.....	24
3.3.1. Configurații ale aptasenzorilor	24
3.3.2. Metode de imobilizare a aptamerilor.....	26
3.3.3. Strategii <i>antifouling</i>	27
3.3.4. Tehnici electrochimice	27
3.4. Aptasenzori electrochimici cu aplicații în sănătatea publică.....	28
CONTRIBUȚII PERSONALE	31
4. Scopul și obiectivele tezei.....	33
5. Metodologia generală	35
5.1. Materiale și instrumente.....	35
5.2. Metode.....	36
5.2.1. Prepararea soluțiilor	36
5.2.2. Protocoale generale SELEX.....	36

5.2.3. Protocoale pentru dezvoltarea aptasenzorilor.....	38
6. Studiul 1. Selecția de aptameri pentru antibiotice din clasa glicopeptidelor utilizând tehnologia SELEX bazată pe particule magnetice	39
6.1. Introducere.....	39
6.2. Obiective.....	40
6.3. Materiale și metode	41
6.3.1. Materiale.....	41
6.3.2. Instrumente.....	42
6.3.3. Metode.....	42
6.3.3.1. Imobilizarea moleculei țintă pe particule magnetice funcționalizate cu grupări carboxil.....	42
6.3.3.2. Selecția <i>in vitro</i>	43
6.3.3.3. Monitorizarea progresului selecției	44
6.3.3.4. Clonare, secvențiere și analiză bioinformatică.....	44
6.3.3.5. Evaluarea afinității prin SPR.....	44
6.3.3.6. Modelare computațională și studii de andocare.....	45
6.4. Rezultate și discuții.....	46
6.4.1. Caracterizarea particulelor magnetice funcționalizate cu Van	46
6.4.2. Screeningul aptamerilor pentru Van.....	49
6.4.3. Clonare, secvențiere și analiză bioinformatică	52
6.4.4. Evaluarea afinității prin SPR.....	57
6.4.5. Modelare computațională și studiu de andocare.....	60
6.4.5.1. Construirea modelului 8H	60
6.4.5.2. Dinamică moleculară avansată a 8H	61
6.4.5.3. Dinamică moleculară convențională a 8H	62
6.4.5.4. Calcule de andocare a 8H și Van	65
6.5. Concluzii.....	67
7. Studiul 2. Strategii personalizate de selecție de aptameri pentru un biomarker al carcinomului hepatocelular	69
7.1. Introducere.....	69
7.2. Obiective.....	70
7.3. Materiale și metode	70
7.3.1. Materiale.....	70
7.3.2. Instrumente.....	72
7.3.3. Metode	72
7.3.3.1. Imobilizarea moleculei țintă pe particule magnetice	72
7.3.3.2. Testul Bradford	73
7.3.3.3. Screeningul de aptameri pentru GPC3 prin tehnologia SELEX bazată pe particule magnetice.....	73
7.3.3.4. Monitorizarea progresului de selecție	75
7.3.3.5. Studii de topire	76
7.3.3.6. Clonare, secvențiere și analiză bioinformatică.....	76
7.3.3.7. Evaluarea afinității prin ITC.....	76

7.4. Rezultate și discuții	77
7.4.1. Caracterizarea particulelor magnetice funcționalizate cu GPC3.....	80
7.4.2. Screeningul de aptameri prin SELEX covalent	80
7.4.3. Screeningul de aptameri prin SELEX his-tag	86
7.4.4. Clonare, secvențiere și analiză bioinformatică.....	90
7.4.5. Evaluarea afinității	95
7.5. Concluzii.....	96
8. Studiul 3. Dezvoltarea unui aptasenzor pentru monitorizarea terapiei cu vancomicină în ser.....	99
8.1. Introducere.....	99
8.2. Obiective	100
8.3. Materiale și metode.....	101
8.3.1. Materiale.....	101
8.3.2. Instrumente.....	101
8.3.3. Metodologie.....	101
8.3.3.1. Dezvoltarea aptasenzorului	101
8.3.3.2. Detecția electrochimică a Van.....	101
8.3.3.3. Studii de selectivitate.....	102
8.3.3.4. Experimente în serum uman comercial îmbogățit	102
8.3.3.5. Validarea clinică.....	102
8.4. Rezultate	103
8.4.1. Dezvoltarea și optimizarea aptasenzorului.....	103
8.4.1.1. Design-ul aptasenzorului	103
8.4.1.2. Activarea și caracterizarea suprafeței AuSPE	104
8.4.1.3. Studii de optimizare a platformei.....	105
8.4.2. Evaluarea performanțelor analitice.....	107
8.4.3. Studii de selectivitate.....	108
8.4.4. Aplicabilitatea în analiza de ser uman.....	110
8.5. Concluzii.....	112
9. Studiul 4. Dezvoltarea unei platforme pe bază de aptameri și compuși tioaromatici pentru detecția alergenilor alimentari.....	113
9.1. Introducere.....	113
9.2. Obiective	114
9.3. Materiale și metode.....	114
9.3.1. Materiale.....	114
9.3.2. Instrumente.....	115
9.3.2. Strategia de dezvoltare a aptasenzorului.....	115
9.3.2.1. Activarea suprafeței electrodului și depunerea de aur.....	116
9.3.2.2. Imobilizarea <i>p</i> -ATP	117
9.3.2.3. Imobilizarea aptamerului	117
9.3.4. Evaluarea electrochimică a Ara h1	117
9.3.5. Studii de selectivitate	117
9.3.6. Analiza de probe reale	118
9.4. Rezultate și discuții	118

9.4.1. Caracterizarea electrochimică a platformei de detecție	118
9.4.2. Dezvoltarea și optimizarea aptasenzorului	122
9.4.2.1. Optimizarea imobilizării de <i>p</i> -ATP	122
9.4.2.2. Optimizarea imobilizării aptamerului și a interacțiunii cu Ara h1	125
9.4.3. Caracterizarea electrochimică a aptasenzorului.....	127
9.4.4. Evaluarea performanțelor analitice	130
9.4.5. Selectivitate, stabilitate și regenerabilitate.....	130
9.4.6. Analiza de probe reale	134
9.5. Concluzii.....	135
10. Concluzii generale	137
11. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei.....	139
REFERINȚE	141
ANEXĂ	159

Cuvinte cheie: aptameri, tehnologia SELEX, aptasenzori electrochimici

LISTA DE PUBLICAȚII

Articole publicate *in extenso* ca rezultat al cercetării doctorale

1. **Casian M**, Manea I, Hosu-Stancioiu O, Lobo Castañón MJ, de-los-Santos-Álvarez N, Cristea C. Targeting hepatocellular carcinoma with aptamers: from biomarker detection to therapeutic applications. *TRAC Trends Anal Chem.* 2025;191:118346. doi: 10.1016/j.trac.2025.118346. *Factor de impact ISI – 12.0, Q1 (inclus în Stadiul actual al cunoașterii).*
2. **Casian M**, Hosu-Stancioiu O, Manea I, Suárez D, Díaz N, Lobo Castañón MJ, de-los-Santos-Álvarez N, Cristea C. Disposable electrochemical aptasensor for rapid and selective vancomycin detection in clinical samples: Bridging affinity selection, computational modeling and clinical validation. *Anal Chim Acta.* 2025; 1374:344519. doi:10.1016/j.aca.2025.344519. *Factor de impact ISI – 6.0, Q1 (inclus în Studile 1 și 3).*
3. **Casian M**, Hosu-Stancioiu O, Ciobanu D, Olaru D, Cristea C. Electrochemically assisted DNA and thioaromatic assembly as sensing and antifouling interface for food allergens. *Microchim Acta.* 2024; 191:97. doi: 10.1007/s00604-023-06146-7. *Factor de impact ISI – 5.3, Q1 (inclus în Studiul 4).*

INTRODUCERE

Sănătatea globală reprezintă o prioritate constantă pentru societatea noastră, iar progresele recente în medicină și nanotehnologie s-au concentrat pe promovarea practicilor de medicină personalizată, abordând în același timp provocări esențiale precum costurile, timpul și accesibilitatea. Tehnicile convenționale utilizate pentru monitorizarea stării de sănătate sau evaluarea contaminării se bazează, de regulă, pe instrumentație sofisticată și costisitoare, necesitând specialiști calificați pentru realizarea analizelor în condiții controlate de laborator. Dezvoltarea tehnologiei de evoluție sistematică a liganzilor prin îmbogățire exponențială (SELEX) a permis izolarea unor elemente noi de biorecunoaștere, cunoscuți sub denumirea de aptameri. Aptamerii sunt secvențe monocatenare de oligonucleotide care pot fi obținuți prin selecție *in vitro*, prezentând afinitate ridicată și stabilitate superioară comparativ cu anticorpii tradiționali. Integrarea acestora în senzori electrochimici a condus la dezvoltarea unor instrumente analitice moderne ce oferă analize rapide, sensibile, descentralizate și rentabile, accesibile chiar și utilizatorilor fără instruire specializată. Prezenta teză a avut ca obiectiv îmbunătățirea gestionării provocărilor de sănătate publică, precum monitorizarea tratamentului cu antibiotice, terapia cancerului și evaluarea siguranței alimentare, prin utilizarea aptamerilor ca elemente de biorecunoaștere. Astfel, au fost investigate două direcții complementare de cercetare: i) selecția *in vitro* și caracterizarea aptamerilor de tip ADN prin tehnologia SELEX bazată pe particule magnetice (MBs-SELEX), aplicată atât pentru molecule țintă mici, cât și pentru biomolecule de dimensiuni mari și ii) dezvoltarea de aptasenzori electrochimici ca platforme de detecție integrabile în dispozitive miniaturizate, destinate analizei descentralizate și facile, pentru abordarea diverselor provocări din domeniul sănătății publice.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Sistemul de sănătate publică a înregistrat progrese semnificative odată cu dezvoltarea tehnologică, orientându-se către obiectivul fundamental de îmbunătățire a calității vieții [1]. Deși eforturile recente s-au concentrat în principal asupra prevenției, diagnosticului și tratamentului, sistemul de sănătate publică continuă să se confrunte cu provocări majore, precum incidența crescută a bolilor infecțioase cauzate de agenți patogeni multirezistenți [2], recurența neoplaziilor și manifestările alergice severe [3]. Aceste aspecte evidențiază necesitatea dezvoltării unor metode analitice inovatoare și eficiente, capabile să sprijine diagnosticul, monitorizarea terapiei și garantarea siguranței alimentare [4].

Aptamerii reprezintă secvențe scurte, monocatenare de ADN sau ARN, caracterizate prin capacitatea de a se lega specific de o gamă largă de molecule țintă, datorită structurilor lor tridimensionale specifice [5]. Aceștia sunt selectați *in vitro* printr-un proces combinatorial de îmbogățire, cunoscut sub denumirea de SELEX [6,7]. Tehnologia se bazează pe principiile evoluției darwiniene la nivel molecular, în cadrul căreia cicluri iterative de selecție și amplificare conduc la îmbogățirea progresivă a bibliotecii inițiale cu oligonucleotide de înaltă afinitate, permițând la finalul selecției persistența secvențelor cu cea mai puternică interacțiune față de molecula țintă [8].

Odată cu descoperirea aptamerilor, în urmă cu peste trei decenii, strategiile SELEX au evoluat în paralel cu progresul tehnologic, vizând optimizarea eficienței, reducerea timpului și a costurilor procesului de selecție [9,10]. O abordare versatilă și promițătoare în acest sens este tehnologia MBs-SELEX, care permite imobilizarea atât a moleculelor mici, cât și a macromoleculelor pe suprafața particulelor magnetice (MBs), utilizate în calitate de matrice suport. MBs oferă multiple avantaje, precum simplitatea separării prin aplicarea unui câmp magnetic, costuri reduse și o flexibilitate operațională ridicată [8]. De asemenea, au fost dezvoltate diverse strategii post-SELEX pentru îmbunătățirea afinității și stabilității aptamerilor izolați, respectiv pentru a contracara limitările asociate degradării enzimaticе, eliminării renale accelerate și apariției răspunsului imun nespecific [11,12]. Aceste strategii includ optimizarea secvenței prin trunchare [13], modificări chimice și conjugarea cu entități funcționale [14].

Comparativ cu anticorpii, considerați etalonul de aur al elementelor de biorecunoaștere, aptamerii prezintă multiple avantaje, precum dimensiuni reduse, stabilitate termodinamică superioară și variabilitatea scăzută între loturi. Un beneficiu essential, deosebit de util pentru dezvoltarea biosenzorilor electrochimici, îl constituie posibilitatea funcționalizării chimice a aptamerilor cu grupări funcționale și markeri redox, facilitează dezvoltarea de platforme de detecție inovative. Dezvoltarea

aptasenzorilor electrochimici pentru testarea la punctul de îngrijire (POC) și punctul de testare (POT), ca instrumente analitice moderne și alternative, reprezintă o direcție de cercetare promițătoare în abordarea provocărilor actuale din domeniul sănătății globale. Acești senzori se disting prin sensibilitate și selectivitate ridicate, costuri reduse, timp de răspuns scurt și portabilitate, permițând extinderea analizelor clinice și de mediu dincolo de laboratoarele specializate, către cabinetele medicale, teren sau chiar mediul domestic [15,16].

CONTRIBUȚII PERSONALE

Studiul 1: Selecția de aptameri pentru antibiotice din clasa glicopeptidelor utilizând tehnologia SELEX bazată pe particule magnetice

Scop / Obiective: Scopul acestui studiu a fost reprezentat de selecția și caracterizarea unor noi aptameri de tip ADN prin tehnologia MBs-SELEX, având ca moleculă țintă vancomicina (Van), un antibiotic glicopeptidic utilizat ca tratament de primă linie în infecțiile cauzate de *Staphylococcus aureus* rezistent la metilicilină (MRSA).

Material și metode: Strategia de selecția a constat în utilizarea unei biblioteci de ADN monocatenare în soluție, în timp ce molecula țintă a fost imobilizată pe MBs, respectiv a fost concepută pentru a simula aplicația clinică vizată a aptamerului în analize serice. Pentru a crește selectivitatea aptamerilor izolați, începând cu runda a cincea a fost introdusă o etapă de contra-selecție utilizând un analog structural din clasa glicopeptidelor, teicoplanina (Teico). Afinitatea de legare a secvențelor izolate pentru Van a fost investigată în diferite configurații prin rezonanță plasmonică de suprafață (SPR), în vederea evaluării influenței modificărilor post-SELEX și a imobilizării aptamerilor asupra afinității de legare, precum și pentru a prezice configurația cu potențialul de a genera cea mai bună performanță analitică a aptasenzorului. De asemenea, au fost efectuate studii computaționale utilizând aptamerul cu cea mai bună afinitate (8H) pentru elucidarea mecanismului de legare și identificarea regiunilor funcționale responsabile de recunoașterea moleculei țintă.

Rezultate: Dintr-un total de nouă runde de selecție, biblioteca de ADN din runda a șaptea a prezentat cel mai ridicat procent de legare față de Van (47 %), concomitent cu o interacțiune minimă cu Teico (< 1 %), indicând o îmbogățire satisfăcătoare a secvențelor și o selectivitate adecvată. Analizele SPR au evidențiat că aptamerii selectați prezintă afinități în domeniul submicromolar și că arhitectura structurală a aptamerului influențează semnificativ constanta de legare. Structura tridimensională a aptamerului 8H a fost determinată utilizând protocolul APTAMD, iar simulările de andocare au generat mai multe modele pentru complexul cu Van, sugerând o interacțiune

predominantă în regiunea care conectează structurile tip *hairpin* 1 și 2, precum și posibilitatea unui mecanism de ajustare conformațională indusă.

Concluzii: Noi aptameri de tip ADN, specifici pentru Van, au fost selectați cu succes prin utilizarea tehnologiei MBs-SELEX. Protocolul de selecție optimizat, conceput pentru a reproduce cât mai fidel condițiile fiziologice, a evidențiat că atunci când molecula țintă prezintă cel puțin o grupare funcțională adecvată pentru imobilizare, MBs-SELEX reprezintă o strategie mai simplă și mai rapidă decât metoda *capture-SELEX* pentru obținerea de aptameri fiabili și selectivi, cu afinități îmbunătățite, necesitând aproximativ jumătate din numărul de runde de selecție. Aptamerul 8H a demonstrat o afinitate de legare superioară aptamerilor specifici Van raportați anterior în literatură, sugerând potențialul său de a fi incorporat într-un senzor electrochimic și calibrat în intervalul clinic relevant.

Studiu 2. Strategii personalizate de selecție de aptameri pentru un biomarker al carcinomului hepatocelular

Scop / Obiective: Scopul acestui studiu a fost selecția unor noi aptameri de tip ADN cu specificitate pentru glypican 3 (GPC3), un biomarker tumoral al carcinomului hepatocelular (HCC), utilizând tehnologia MBs-SELEX. Obiectivul final a vizat dezvoltarea unui element de biorecunoaștere moleculară cu potențial de integrare într-un sistem de livrare țintită a medicamentelor, în scopul optimizării tratamentului sistemic al HCC în stadiile avansate.

Material și metode: Au fost implementate două protocoale SELEX utilizând strategii diferite de imobilizare a GPC3 pe suporturi solide. În primul protocol, s-a ales o abordare de imobilizare aleatorie prin intermediul MBs funcționalizate cu grupări tosil, pentru a forma legături covalente cu grupările amino primare din structura GPC3 (SELEX covalent). În al doilea protocol, s-a realizat o imobilizare orientată, prin atașarea GPC3 pe MBs funcționalizate cu Ni²⁺, prin complexarea coordinativă cu molecula de hexahistidină aflată la capătul C-terminal al proteinei (SELEX his-tag). Amplificarea aptamerilor în cadrul rundelor de selecție a fost optimizată prin PCR cantitativ în timp real (qPCR), iar îmbogățirea bibliotecii de ADN cu secvențe caracterizate de afinitate crescută pentru GPC3 a fost monitorizată prin teste UV-VIS și fluorescență.

Rezultate: Integrarea qPCR în fluxul SELEX a permis optimizarea procesului de amplificare și cuantificarea ADN-ului monocatenar obținut după fiecare rundă de selecție. Astfel, formarea artefactelor de tip *primer-dimer* a fost semnificativ redusă comparativ cu rezultatele obținute în cadrul selecției de aptameri pentru Van (Studiul 1), evidențiind utilitatea qPCR. De asemenea, qPCR a permis cuantificarea precisă a ADN-ului monocatenar recuperat după fiecare rundă, permițând o monitorizare detaliată și dinamică a evoluției selecției, spre deosebire de utilizarea exclusivă a testelor de îmbogățire post-SELEX. Pe baza rezultatelor acestor teste, rundele 4 (SELEX

covalent) și 5 (SELEX his-tag) au fost clonate și secvențiate, obținându-se câte 25 de secvențe primare pentru fiecare rundă. Analiza bioinformatică a permis identificarea mai multor aptameri caracterizați prin motive recurente distincte, capabile să recunoască epitopi diferiți ai GPC3.

Concluzii: Utilizând tehnologia MBs-SELEX au fost izolați aptameri noi de tip ADN pentru GPC3, confirmând versatilitatea acestei tehnologii în selecția aptamerilor atât pentru molecule mici, cât și pentru biomolecule de dimensiuni mari. Protocolul de selecție optimizat a depășit cu succes limitările identificate în Studiul 1, în special formarea produșilor secundari de amplificare PCR și monitorizarea limitată a procesului de selecție. De asemenea, utilizarea unor strategii distincte de imobilizare a GPC3 a condus la obținerea mai multor secvențe de aptameri cu regiuni de legare diferite, ceea ce poate fi valorificat pentru selectarea de perechi de aptameri vizând situsuri distincte ale proteinei țintă, în vederea dezvoltării unor configurații de tip sandwich. Această abordare ar putea crește potențialul de recunoaștere al sistemului de terapie la țintă, îmbunătățind astfel capacitatea de diferențiere a celulelor HCC de cele sănătoase.

Studiul 3. Dezvoltarea unui aptasenzor pentru monitorizarea terapiei cu vancomicină în ser

Scop / Obiective: Scopul acestui studiu a fost demonstrarea capacității de recunoaștere și legare a aptamerului 8H, selectat anterior pentru Van (descries în Studiul 1), în matrici biologice complexe, prin integrarea sa într-o platformă electrochimică destinată monitorizării terapiei medicamentoase (TDM).

Material și metode: Aptasenzorului electrochimic a fost fabricat utilizând electrozi serigrafiați de aur, pe care a fost imobilizat aptamerul 8H prin legături covalente Au-tiol, aplicând amperometria multipuls. Ulterior, suprafața a fost blocată cu un tiol aromatic, *p*-aminotiofenol (*p*-ATP), pentru a înlocui moleculele de ADN adsorbite nespecific și pentru a ocupa situsurile libere rămase pe suprafața electrozului de aur. Fabricarea aptasenzorului, optimizarea platformei și interacțiunea cu Van au fost monitorizate electrochimic prin voltametria puls diferențială (DPV), utilizând amestecul ferrocianură/ferricianură ca sondă redox.

Rezultate: Aptasenzorul dezvoltat a fost calibrat în intervalul clinic relevant (2.5 – 50 μM), frecvent întâlnit în TDM, pentru a stabili cu acuratețe relația semnal-concentrație, adecvată aplicațiilor POC. Studiile de cross-reactivitate, efectuate cu diverse medicamente administrate concomitent în secțiile de terapie intensivă (gentamicină, amoxicilină, acetaminofen) au evidențiat selectivitatea aptamerului față de Van, reducând riscul răspunsurilor fals-pozitive în medii biologice complexe. Aptasenzorul a fost validat clinic utilizând probe de ser de la pacienți spitalizați aflați sub tratament cu Van. Rezultatele obținute prin analiza serului cu aptasenzorul electrochimic au

prezentat o corelație excelentă cu cele obținute prin metoda standard turbidimetrica imunoenzimatică PETINIA ($R^2=0.994$), demonstrând capacitatea aptasenzorului de a cuantifica Van în serul uman și evidențiind potențialul său ca alternativă rapidă și viabilă pentru TDM la patul pacientului.

Concluzii: Aptamerul 8H specific pentru Van a fost utilizat cu succes în dezvoltarea unui aptasenzor electrochimic destinat aplicațiilor de tip TDM. Aptasenzorul a permis stratificarea corectă a nivelurilor de Van în probele clinice analizate, evidențiind un potențial ridicat pentru ghidarea rapidă a recomandărilor de dozaj (în aproximativ 40 de minute) comparativ cu metodele curente utilizate în laboratoarele de analiză. Deși studiul a fost realizat pe un număr limitat de pacienți, rezultatele oferă o dovadă promițătoare a conceptului, susținând utilizarea aptasenzorilor electrochimici pentru TDM direct la patul pacientului.

Studiul 4. Dezvoltarea unei platforme pe bază de aptameri și compuși tioaromatici pentru detecția alergenilor alimentari

Scop / Obiective: Scopul acestui studiu a fost dezvoltarea unui aptasenzor electrochimic rapid, sensibil și miniaturizabil pentru detecția alergenului alimentar Ara h1, menit să contribuie la reducerea riscului de reacții alergice induse de arahide și la îmbunătățirea monitorizării siguranței alimentare.

Material și metode: Pentru selectarea celei mai potrivite platforme pentru dezvoltarea aptasenzorului, au fost caracterizate electrochimic și optimizate prin depunere de nanoparticule de aur diverse tipuri de electrozi serigrafiați pe bază de carbon și aur disponibili comercial. Pentru imobilizarea secvenței de aptamer specifică pentru Ara h1, au fost comparate două strategii (metoda *backfilling* versus metoda *inserting*), evaluându-se influența acestora asupra orientării aptamerului, densității suprafeței și a proprietăților *antifouling*. Ca agent de blocare s-a utilizat un tiol aromatic (*p*-ATP). Grefarea *p*-ATP-ului și a aptamerului pe electrozi serigrafiați de aur a fost monitorizată prin voltametrie ciclică (CV), DPV și spectroscopie de impedanță electrochimică (EIS). Detecția electrochimică a proteinei Ara h1 a fost evaluată indirect prin DPV și EIS în prezența sondei redox ferrocianură/ferricianură. Parametrii analitici, precum sensibilitatea, selectivitatea, stabilitatea și regenerabilitatea, au fost evaluați sistemic pentru a determina performanța aptasenzorului dezvoltat.

Rezultate: Abordarea *inserting*, în care aptamerul a fost imobilizat în cadrul unei rețele preformate de *p*-ATP, a generat o schimbare de semnal mai mare în cadrul interacțiunii cu Ara h1 comparativ cu metoda *backfilling*. Aceste rezultate au evidențiat importanța *p*-ATP-ului în promovarea unei orientări uniforme și controlate a aptamerului, datorită rigidității sale structurale, asigurând totodată blocarea eficientă a suprafeței și efectul *antifouling*. Aptasenzorului dezvoltat a prezentat limite de detecție satisfăcătoare prin DPV (3.24 nM) și EIS (14.08 nM), ambele sub pragul clinic relevant pentru Ara h1 și a

demonstrat o selectivitate excelentă față de proteine interferente întâlnite frecvent în matrici alimentare. Studiile de stabilitate au arătat faptul că aptasenzorul și-a menținut 92.27 ± 0.27 % din răspunsul inițial după 7 zile de depozitare, confirmând posibilitatea utilizării lui pe perioade extinse. De asemenea, platforma de detecție a demonstrat o capacitate de regenerare prin tratament chimic cu soluții cu forță ionică ridicată, păstrând o sensibilitate ridicată față de Ara h1 (102.1 ± 1.6 %). În final, aptasenzorul a fost aplicat cu succes pentru determinarea Ara h1 în diverse băuturi și produse alimentare, obținând rate de recuperare foarte bune (88.59 - 112.1 %, RSD < 2.6 %).

Concluzii: A fost dezvoltat un aptasenzor electrochimic simplu și rapid pentru detecția alergenului Ara h1 din arahide în probe alimentare. Aptasenzorului rezultat prezintă o metodă alternativă promițătoare pentru detecția POT, cu potențialul de a reduce riscurile alergice și de a minimiza utilizarea etichetării preventive a alergenilor, îmbunătățind astfel siguranța consumatorilor și calitatea vieții.

CONCLUZII GENERALE

Aptamerii sunt elemente de biorecunoaștere versatile, care pot fi proiectați prin selecție *in vitro* pentru a prezenta proprietăți specifice, adaptate aplicațiilor vizate. Afinitatea și selectivitatea lor ridicată le conferă un rol important în introducerea specificității în diverse platforme analitice, precum aptasenzorii electrochimici și sistemele de livrare la țintă a medicamentelor.

Prezenta teză a investigat aplicațiile variate ale aptamerilor și potențialul lor semnificativ în abordarea unor provocări majore de sănătate publică, precum rezistența la antibiotice, terapia cancerului și siguranța alimentară. Cercetarea s-a concentrat pe două direcții principale: selecția și caracterizarea aptamerilor prin MBs-SELEX și dezvoltarea de aptasenzori electrochimici pentru aplicații POC și POT. În ambele direcții, aptamerii au fost testați pentru proprietățile lor de recunoaștere a unor molecule țintă variate, de la compuși chimici de dimensiuni reduse până la biomarkeri proteici.

În primul studiu, au fost selectați aptameri noi pentru Van, un antibiotic din clasa glicopeptidelor, utilizând un protocol SELEX optimizat pentru a simula cât mai fidel condițiile serice fiziologice. Această abordare a permis izolarea unor aptameri capabili să discrimineze între analogi structurali. Analiza SPR a identificat aptamerului 8H drept cel mai performant candidat, cu o afinitate de legare superioară celor doi aptameri raportați anterior în literatură. De asemenea, structura tridimensională a aptamerului 8H a fost determinată prin modelări computaționale folosind protocolul APTAMD, iar simulările de andocare moleculară au furnizat mai multe modele ce descriu mecanismul de legare dintre aptamer și Van.

În al doilea studiu, au fost selectați aptameri noi caracterizați de afinitate ridicată față de GPC3, un biomarker tumoral specific HCC, demonstrând versatilitatea MBs-

SELEX în selecția aptamerilor pentru molecule de dimensiuni diferite. Profitând de multiplele grupări funcționale oferite de structura complexă a proteinei țintă, au fost concepute diverse strategii de imobilizare a GPC3 pe suportul solid. Această abordare a condus la selecția unor secvențe distincte de aptameri, capabile să recunoască epitopi diferiți ai proteinei. Protocolul de selecție a integrat qPCR pentru monitorizarea procesului de amplificare și evaluarea îmbogățirii secvențelor cu afinitate pentru GPC3, permițând astfel o evaluare în timp real a progresului selecției și reducerea formării artefactelor de amplificare, o provocare observată anterior în SELEX-ul pentru Van.

În al treilea studiu, aptamerul 8H selectat anterior pentru Van a fost integrat cu succes într-un aptasenzor electrochimic conceput pentru aplicații de TDM. Aptasenzorul a fost calibrat pe un interval de concentrații relevante clinic și validat pe probe de ser prelevate de la pacienți spitalizați aflați sub tratament cu Van. Rezultatele obținute au arătat o corelație excelentă cu testul imunoenzimatic standard PETINIA utilizat în practica clinică, demonstrând potențialul aptasenzorului de a furniza rezultate rapide și de a sprijini recomandările de dozaj în aproximativ 40 de minute.

Ultimul studiu din această teză a explorat aplicabilitatea aptamerilor în domeniul siguranței alimentare, prin dezvoltarea unui aptasenzor electrochimic simplu, rapid și sensibil pentru detecția alergenului Ara h1 din arahide. Studiul a investigat influența diferitelor metode de imobilizare a aptamerilor și a strategiilor *antifouling* asupra capacității de recunoaștere Ara h1 în matrici alimentare complexe. Platforma optimizată a permis detecția Ara h1 sub niveluri cunoscute pentru declanșarea reacțiilor alergice, a demonstrat selectivitate excelentă față de principalele proteine interferente din matrici alimentare și a fost aplicată cu succes pentru determinarea Ara h1 în diverse produse alimentare. Aptasenzorul dezvoltat reprezintă o soluție promițătoare pentru analiza POT, contribuind la creșterea siguranței consumatorilor și la îmbunătățirea calității vieții.

În concluzie, studiile prezentate în această teză evidențiază versatilitatea și utilitatea practică a aptamerilor integrați în senzori electrochimici, ca instrumente alternative rapide, sensibile și rentabile pentru analize în diverse domenii în vederea asigurării sănătății publice.

ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE CERCETĂRII DOCTORALE

Originalitatea tezei constă în analiza riguroasă a aptamerilor ca elemente de biorecunoaștere, pornind de la procesul de selecție *in vitro* prin tehnologia SELEX până la dezvoltarea de platforme electrochimice de detecție și aplicarea acestora în sprijinul abordării unor provocări majore de sănătate publică.

Un aspect inovator esențial al tezei îl reprezintă designul și optimizarea strategiei MBs-SELEX pentru selecția *in vitro* a unor aptameri noi de tip ADN pentru ținte precum

Van, un antibiotic glicopeptidic utilizat ca tratament de primă linie împotriva infecțiilor cu MRSA și GPC3, un biomarker tumoral exprimat în carcinomul hepatocelular. Ambele protocoale SELEX au fost adaptate pentru a reproduce cât mai fidel condițiile fiziologice, asigurând astfel succesul aptamerilor în aplicațiile propuse. Strategia de selecție elaborată a permis izolarea unor aptameri cu afinități ridicate pentru Van și GPC3, chiar și fără optimizări post-SELEX, comparativ cu ceilalți aptameri truncați raportați anterior în literatură.

Un alt element de noutate este reprezentat de integrarea modelării computaționale în protocolul de selecție al aptamerilor. În colaborare cu cercetătorii de la Universitatea din Oviedo, protocolul APTAMD dezvoltat în laborator a fost utilizat cu succes pentru a determina structura tridimensională a aptamerului selectat pentru Van și pentru a efectua studii de andocare moleculară. Această abordare a oferit informații valoroase privind mecanismul de interacțiune aptamer-țintă, completând validarea experimentală și sprijinind designul rațional a modificărilor post-SELEX (precum truncarea sau funcționalizarea chimică), cu potențialul de extindere a aplicațiilor aptamerilor selectați în dezvoltarea de biosenzori.

De asemenea, teza demonstrează translația cu succes a aptamerilor în biosenzori funcționali. Aptamerul selectat pentru Van a fost integrat într-un aptasenzor electrochimic caracterizat prin cost redus și timp de răspuns rapid, destinat TDM a Van în context clinic. Aptasenzorul a fost calibrat pe intervalul de concentrații relevante clinic și validat utilizând probe de ser provenite de la pacienți spitalizați aflați sub tratament cu Van. Platforma dezvoltată a prezentat o corelație puternică cu testul imunoenzimatic standard PETINIA în cadrul probelor analizate, oferind o alternativă rapidă și rentabilă pentru susținerea recomandărilor de dozaj și personalizarea tratamentului antibiotic. În plus față de noutatea reprezentată de aptamerul de tip ADN identificat, platforma dezvoltată constituie primul aptasenzor electrochimic nemarcat validat clinic raportat în literatură pentru TDM al Van.

O altă contribuție semnificativă a fost dezvoltarea unui aptasenzor electrochimic sensibil, rapid și miniaturizabil, conceput pentru evaluarea cantitativă a riscului de expunere la alergeni în produsele alimentare, fără a necesita proceduri complexe de extracție. Aptasenzorul a fost aplicat cu succes pentru monitorizarea alergenului Ara h1 în produse alimentare comerciale și se numără printre pușinii aptasenzori electrochimici raportați în literatură pentru monitorizarea siguranței alimentare în cazul alergiilor la arahide.

În ansamblu, cercetarea prezentată în această teză evidențiază versatilitatea și utilitatea aptamerilor ca elemente de biorecunoaștere în aplicații diverse legate de asigurarea sănătății publice, incluzând monitorizarea tratamentului cu antibiotice, terapia cancerului și siguranța alimentară. Prin abordarea simultană a aspectelor fundamentale ale selecției *in vitro* de aptameri și a dezvoltării practice a aptasenzorilor

electrochimici, această teză prezintă un liant între proiectarea moleculară a noilor elemente de biorecunoaștere și aplicațiile lor concrete în lumea reală.

REFERINȚE

1. Zaidan AM. The leading global health challenges in the artificial intelligence era. *Front Public Health*. 2023;11:1328918. doi: 10.3389/fpubh.2023.1328918.
2. Theuretzbacher U. The global resistance problem and the clinical antibacterial pipeline. *Nat Rev Microbiol*. 2025;23(8):491-508. doi: 10.1038/s41579-025-01169-8.
3. Melinte G, Hosu O, Cristea C, Marrazza G. DNA sensing technology a useful food scanning tool. *TrAC, Trends Anal Chem*. 2022;154:116679. doi: 10.1016/j.trac.2022.116679.
4. Gao F, Yin J, Chen Y, Guo C, Hu H, Su J. Recent advances in aptamer-based targeted drug delivery systems for cancer therapy. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022;10. doi: 10.3389/fbioe.2022.972933.
5. Ștefan G, Hosu O, De Wael K, Lobo-Castañón MJ, Cristea C. Aptamers in biomedicine: Selection strategies and recent advances. *Electrochim Acta*. 2021;376:137994. doi: 10.1016/j.electacta.2021.137994.
6. Ellington AD, Szostak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*. 1990;346(6287):818-822. doi: 10.1038/346818a0.
7. Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*. 1990;249(4968):505-510. doi: 10.1126/science.2200121.
8. Manea I, Casian M, Hosu-Stancioiu O, de-los-Santos-Álvarez N, Lobo-Castañón MJ, Cristea C. A review on magnetic beads-based SELEX technologies: Applications from small to large target molecules. *Anal Chim Acta*. 2024;1297:342325. doi: 10.1016/j.aca.2024.342325.
9. Szeitner Z, András J, Gyurcsányi RE, Mészáros T. Is less more? Lessons from aptamer selection strategies. *J Pharm Biomed Anal*. 2014;101:58-65. doi: 10.1016/j.jpba.2014.04.018.
10. Kohlberger M, Gadermaier G. SELEX: Critical factors and optimization strategies for successful aptamer selection. *Biotechnol Appl Biochem*. 2022;69(5):1771-1792. doi: 10.1002/bab.2244.
11. Gao S, Zheng X, Jiao B, Wang L. Post-SELEX optimization of aptamers. *Anal Bioanal Chem*. 2016;408(17):4567-4573. doi: 10.1007/s00216-016-9556-2.
12. Ni S, Zhuo Z, Pan Y, Yu Y, Li F, Liu J, et al. Recent Progress in Aptamer Discoveries and Modifications for Therapeutic Applications. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2021;13(8):9500-9519. doi: 10.1021/acsami.0c05750.
13. Díaz-Fernández A, Miranda-Castro R, de-los-Santos-Álvarez N, Rodríguez EF, Lobo-Castañón MJ. Focusing aptamer selection on the glycan structure of prostate-specific antigen: Toward more specific detection of prostate cancer. *Biosens Bioelectron*. 2019;128:83-90. doi: 10.1016/j.bios.2018.12.040.
14. Casian M, Manea I, Hosu-Stancioiu O, Lobo Castañón MJ, de-los-Santos-Álvarez N, Cristea C. Targeting hepatocellular carcinoma with aptamers: from biomarker detection to therapeutic applications. *TrAC Trends Anal Chem*. 2025;191:118346. doi: 10.1016/j.trac.2025.118346.
15. da Silva ETSG, Souto DEP, Barragan JTC, de F. Giarola J, de Moraes ACM, Kubota LT. Electrochemical Biosensors in Point-of-Care Devices: Recent Advances and Future Trends. *ChemElectroChem*. 2017;4(4):778-794. doi: 10.1002/celec.201600758.

16. Wu J, Liu H, Chen W, Ma B, Ju H. Device integration of electrochemical biosensors. *Nat Rev Bioeng.* 2023;1(5):346–360. doi: 10.1038/s44222-023-00032-w.

SUMMARY OF THE DOCTORAL THESIS

New analytical tools to address global health challenges: aptamers and their use in electrochemical sensors

PhD candidate: **Magdolna CASIAN**

PhD coordinators: **Prof. Dr. Cecilia CRISTEA**

Prof. Dr. Noemí DE-LOS-SANTOS-ÁLVAREZ



Universidad de Oviedo



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	1
STATE OF THE ART	3
1. Global health challenges	5
1.1. Bacterial infections and antibiotic resistance	5
1.2. Cancers	7
1.3. Food safety	8
2. Aptamers and SELEX technology	9
2.1. The theory of SELEX	9
2.2. Aptamer-target interaction mechanism	10
2.3. Evolution of SELEX strategies	12
2.3.1. Targets immobilized on solid support	12
2.3.2. Aptamers immobilized on solid support	13
2.3.3. Aptamers and targets free in solution	13
2.3.4. Strategies for in vivo applications	14
2.4. Post-SELEX optimization	16
2.5. Aptamer characterization	17
2.5.1. Equilibrium characterization and thermodynamics	17
2.5.2. Affinity evaluation techniques	18
3. Electrochemical biosensors as tools for global health challenges	21
3.1. Biosensing fundamentals	21
3.2. Biorecognition elements	22
3.3. Electrochemical aptasensors	24
3.3.1. Aptasensor configurations	24
3.3.2. Aptamer immobilization chemistry	26
3.3.3. Antifouling strategies	27
3.3.4. Electrochemical techniques	27
3.4. Electrochemical aptasensors for global health applications	28
PERSONAL CONTRIBUTIONS	31
4. Aim and objectives of the thesis	33
5. General methodology	35
5.1. Materials and instruments	35
5.2. Methods	36
5.2.1. Solution preparation	36
5.2.2. General SELEX protocols	36
5.2.3. Aptasensor development protocols	38

6. Study 1. Aptamer selection targeting glycopeptide antibiotic by magnetic beads SELEX technology	39
6.1. Introduction	39
6.2. Objectives	40
6.3. Materials and methods	41
6.3.1. Materials	41
6.3.2. Instrumentation	41
6.3.3. Methods	42
6.3.3.1. Target immobilization on carboxyl-functionalized MBs	42
6.3.3.2. In vitro selection	43
6.3.3.3. Enrichment monitoring	43
6.3.3.4. Cloning, sequencing and bioinformatic analysis	44
6.3.3.5. Affinity evaluation by SPR	44
6.3.3.6. Computational modeling and docking studies	45
6.4. Results and discussions	46
6.4.1. Characterization of Van functionalized MBs	46
6.4.2. Screening of Van-binding aptamers	49
6.4.3. Cloning, sequencing and bioinformatic analysis	52
6.4.4. Affinity evaluation by SPR	57
6.4.5. Computational modeling and docking study	60
6.4.5.1. 8H model building	60
6.4.5.2. Enhanced Molecular Dynamics of 8H	61
6.4.5.3. Conventional Molecular Dynamics (cMD) of 8H	62
6.4.5.4. Docking calculations of 8H and Van	65
6.5. Conclusions	67
7. Study 2. Tailored aptamer selection strategies targeting hepatocellular carcinoma biomarker	69
7.1. Introduction	69
7.2. Objectives	70
7.3. Materials and methods	70
7.3.1. Materials	70
7.3.2. Instrumentation	71
7.3.3. Methods	72
7.3.3.1. Target immobilization on MBs	72
7.3.3.2. Bradford assay	73
7.3.3.3. GPC3-targeting aptamer screening by MBs-SELEX	73
7.3.3.4. Enrichment assay	75
7.3.3.5. Remelting studies	76
7.3.3.6. Cloning, sequencing and bioinformatic analysis	76
7.3.3.7. Affinity evaluation by ITC measurements	76
7.4. Results and discussions	77
7.4.1. Characterization of GPC3-functionalized MBs	77
7.4.2. Screening of aptamers by covalent SELEX	80
7.4.3. Screening of aptamers by his-tag SELEX	86

7.4.4. Cloning, sequencing and bioinformatic analysis.....	90
7.4.5. Affinity evaluation.....	95
7.5. Conclusions.....	96
8. Study 3. Aptasensor development for therapeutic drug monitoring of vancomycin in serum	99
8.1. Introduction	99
8.2. Objectives	100
8.3. Materials and methods	101
8.3.1. Materials.....	101
8.3.2. Instrumentation	101
8.3.3. Methodology	101
8.3.3.1. Aptasensor preparation.....	101
8.3.3.2. Electrochemical Van detection	101
8.3.3.3. Selectivity studies.....	102
8.3.3.4. Spiking experiment in commercial human serum	102
8.3.3.5. Clinical validation.....	102
8.4. Results	103
8.4.1. Aptasensor design and optimization.....	103
8.4.1.1. Aptasensor design.....	103
8.4.1.2. AuSPE surface activation and characterization.....	104
8.4.1.3. Platform optimization studies	105
8.4.2. Analytical performance evaluation.....	107
8.4.3. Selectivity studies.....	108
8.4.4. Stability and reproducibility.....	109
8.4.5. Applicability in human serum analysis	110
8.5. Conclusions.....	112
9. Study 4. Aptamer and thioaromatic assembly as antifouling interface for food allergens.....	113
9.1. Introduction	113
9.2. Objectives	114
9.3. Materials and methods	114
9.3.1. Materials.....	114
9.3.2. Instruments.....	115
9.3.2. Aptasensor development strategy	115
9.3.2.1. Electrode surface activation and gold deposition	116
9.3.2.2. p-ATP immobilization.....	117
9.3.2.3. Aptamer grafting.....	117
9.3.2.4. Electrochemical Ara h1 assessment.....	117
9.3.2.5. Selectivity studies.....	117
9.3.2.6. Real sample analysis	118
9.4. Results and discussions.....	118
9.4.1. Sensing platform electrochemical characterization	118
9.4.2. Aptasensor development and optimization	122
9.4.2.1. Optimization of p-ATP immobilization	122

9.4.2.2. Optimization of aptamer immobilization and Ara h1 interaction.....	125
9.4.3. Electrochemical characterization of the aptasensor	127
9.4.4. Analytical performance evaluation.....	130
9.4.5. Selectivity, stability and regenerability	132
9.4.6. Real sample analysis	134
9.5. Conclusions.....	135
10. General conclusions	137
11. Originality and innovative contributions of the doctoral research ..	139
REFERENCES	141
ANNEX	159

Keywords: aptamers, SELEX technology, electrochemical aptasensors

LIST OF PUBLICATIONS

In extenso published articles as a result of the doctoral thesis research

1. **Casian M**, Manea I, Hosu-Stancioiu O, Lobo Castañón MJ, de-los-Santos-Álvarez N, Cristea C. Targeting hepatocellular carcinoma with aptamers: from biomarker detection to therapeutic applications. *TRAC Trends Anal Chem.* 2025;191:118346. doi: 10.1016/j.trac.2025.118346. *ISI Impact Factor – 12.0, Q1 (included in State of the Art).*
2. **Casian M**, Hosu-Stancioiu O, Manea I, Suárez D, Díaz N, Lobo Castañón MJ, de-los-Santos-Álvarez N, Cristea C. Disposable electrochemical aptasensor for rapid and selective vancomycin detection in clinical samples: Bridging affinity selection, computational modeling and clinical validation. *Anal Chim Acta.* 2025; 1374:344519. doi:10.1016/j.aca.2025.344159. *ISI Impact Factor – 6.0, Q1 (included in Studies 1 and 3).*
3. **Casian M**, Hosu-Stancioiu O, Ciobanu D, Olaru D, Cristea C. Electrochemically assisted DNA and thioaromatic assembly as sensing and antifouling interface for food allergens. *Microchim Acta.* 2024; 191:97. doi: 10.1007/s00604-023-06146-7. *ISI Impact Factor – 5.3, Q1 (included in Study 4).*

INTRODUCTION

Global health has been a constant priority for our society and recent advances in medicine and nanotechnology have focused on promoting more personalized medicine practices while addressing key challenges such as cost, time and accessibility. Gold-standard techniques used for health monitoring or contamination assessment typically rely on sophisticated, expensive instrumentation and require skilled professionals to conduct analyses in controlled laboratory settings. The development of systemic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) technology has enabled the isolation of novel biorecognition elements, known as aptamers. Aptamers are single-stranded oligonucleotide sequences that can be engineered through *in vitro* selection to exhibit high affinity and superior stability compared to traditional antibodies. Their integration into electrochemical sensors has led to the emergence of modern analytical tools that offer rapid, sensitive, decentralized and cost-effective analyses accessible even to untrained users. This thesis aimed to improve the management of global health challenges such as antibiotic treatment monitoring, cancer therapy and food safety assessment through the use of aptamers as biorecognition elements. Two complementary research directions were investigated: i) the *in vitro* selection and characterization of DNA aptamers using magnetic beads-based SELEX (MBs-SELEX) technology for both small and large target molecules and ii) the development of disposable electrochemical aptasensors as efficient and cost-effective tools for tackling global health challenges.

STATE OF THE ART

Global public healthcare has undergone substantial improvements with the advancement of technology, aimed at enhancing the overall quality of life [1]. While efforts have increasingly focused on prevention, diagnostics and treatment, the current global healthcare landscape continues to face critical challenges, such as the rising prevalence of infectious diseases with multi-drug resistant pathogens [2], malignancies and allergic reactions [3]. This underscores the urgent need for novel, efficient analytical tools that can support and improve multiple aspects of healthcare systems, including diagnostics, treatment monitoring and food safety [4].

Aptamers are short, single-stranded DNA or RNA sequences capable of specifically binding to a wide range of target molecules through their tailored three-dimensional structure [5]. They are selected in the laboratory using an *in vitro* combinatorial enrichment process known as SELEX [6,7]. This technology is based on the principles of Darwinian evolution at a molecular level, wherein iterative rounds of selection and amplification progressively enrich the pool with high-affinity oligonucleotide sequences, ultimately favoring the survival of those exhibiting the strongest binding to the target molecule [8].

Since the discovery of aptamers over three decades ago, SELEX strategies have continuously evolved alongside technological advancements, aiming to improve the efficiency, speed and cost-effectiveness of the selection process [9, 10]. A promising and versatile approach for aptamer selection is MBs-SELEX, which enables the coupling of both small and large molecules to the immobilization matrix. MBs offer several advantages, including simplicity of separation using a magnetic field, cost-effectiveness and operational versatility [8]. Various post-SELEX modification strategies have been developed to enhance the affinity and stability of aptamers and to mitigate concern regarding nuclease degradation, rapid renal clearance or non-specific immune response [11,12]. These include sequence optimization through truncation [13], chemical modifications and conjugation with functional molecules [14].

Aptamers have many attractive features compared to the gold standard antibodies, such as smaller size, higher stability and lower batch-to-batch variation. One important advantage of aptamers for electrochemical biosensing applications is their ability to be chemically functionalized with various functional groups and redox labels, allowing for the design of versatile aptasensor configurations [14]. The development of point-of-care (POC) and point-of-test (POT) electrochemical aptasensors as modern, alternative analytical tools could be particularly promising for addressing various global health challenges. These sensors offer exceptional attributes, including high sensitivity

and selectivity, low cost, rapid response and portability, enabling clinical or environmental analyses to extend beyond specialized laboratories to public settings, such as hospitals, on-site fields and home settings [15,16].

PERSONAL CONTRIBUTIONS

Study 1: Aptamer selection targeting glycopeptide antibiotic by magnetic beads SELEX technology

Aim / Objectives: The aim of this study was the selection and characterization of novel DNA aptamers by MBs-SELEX technology targeting vancomycin (Van), a glycopeptide antibiotic used as a first line treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections.

Materials and methods: The selection strategy employed a single-stranded DNA library in solution, with the target molecule immobilized on MBs and was designed to mimic the intended clinical application of the aptamer for serum analysis. To enhance the selectivity of the isolated aptamers, a counter-selection step using teicoplanin (Teico), a structural analog from the glycopeptide antibiotic class was introduced starting from the 5th round of selection. The binding behavior of the isolated sequences in different configurations was studied by surface plasmon resonance (SPR) to evaluate the influence of post-SELEX modifications and aptamer immobilization on binding affinity and to predict which configuration would yield the highest sensor performance. Additionally, computational studies were conducted on the most promising aptamer (8H) to investigate its folding mechanism and identify the functional regions responsible for target binding.

Results: From a total of 9 selection rounds, the DNA pool from round 7 exhibited the highest binding percentage towards Van (47%), while showing minimal binding to Teico (<1%), indicating satisfactory sequence enrichment and selectivity. SPR studies revealed that the selected aptamers presented affinities in the submicromolar range and that aptamer configuration significantly influences the binding constant. The 3D structure of the selected aptamer was reliably predicted using the APTAMD protocol and docking simulations provided several models for its complex with Van that systematically point to the binding in the region connecting hairpins 1 and 2 and the possibility to an induced fit.

Conclusions: Novel DNA aptamers targeting Van were successfully selected using MB-SELEX. The optimized selection protocol, which was designed to closely simulate physiological conditions demonstrated that when the target molecule has at least one suitable functional group for binding, MB-SELEX is a simpler and faster approach than capture-SELEX for obtaining reliable and selective aptamers with improved affinities,

requiring approximately half the number of selection rounds. The best aptamer candidate (8H) displayed slightly improved binding affinity over the previously reported Van aptamers, suggesting potential calibration within the clinically relevant range.

Study 2. Tailored aptamer selection strategies targeting hepatocellular carcinoma biomarker

Aim / Objectives: This study aimed the selection of novel DNA aptamers targeting glypican 3 (GPC3), a clinically relevant tumor biomarker of hepatocellular carcinoma (HCC), using MBs-SELEX technology. The final goal of this study was the development of a molecular recognition element that could be used for the development of a targeted drug delivery system for the improvement of the systemic treatment in the advanced stages of HCC.

Materials and methods: Two SELEX trials were conducted using different GPC3 immobilization strategies on solid supports. In the first trial, a random immobilization approach was employed using tosylactivated MBs, which formed covalent bonds with the primary amino groups on the GPC3 structure (covalent SELEX). In the second trial, a more oriented immobilization was achieved by attaching GPC3 via its C-terminal hexahistidine tag to Ni⁺²-functionalized magnetic particles, enabling site-directed attachment through metal-coordination complexes (his-tag SELEX). Aptamer amplification during the selection rounds was optimized using real-time quantitative PCR (qPCR). Enrichment of GPC3-binding sequences was monitored using UV-VIS and fluorescence assays.

Results: The integration of qPCR into the SELEX workflow enabled the optimization of the amplification process and the quantification of ssDNA recovered after each selection round. Thus, primer-dimer formation was significantly lower than in the previous Van-SELEX (described in Study 1), highlighting the usefulness of qPCR. Moreover, qPCR enabled the quantification of ssDNA separated after each selection round, providing a more detailed and dynamic understanding of the selection evolution, rather than relying only on post-selection enrichment assay. Based on the enrichment assay results, rounds 4 (from covalent SELEX) and 5 (from his-tag SELEX) were cloned and sequenced, obtaining 25 sequences for each selection round. Bioinformatic analysis enabled the identification of multiple aptamer sequences characterized by distinct recurrent motifs that may recognize different epitopes of GPC3.

Conclusions: Novel GPC3-binding aptamers were successfully isolated via MBs-SELEX technology, highlighting the versatility of this type of SELEX for aptamer screening for both small and large size molecules. The carefully designed and optimized selection protocol successfully addressed key limitations identified in Study 1, specifically the formation of PCR by-products and the limited monitoring of the selection process.

Moreover, the various immobilization chemistries employed for the attachment of GPC3 on MBs led to the selection of multiple aptamer sequences with distinct recurrent binding motifs, which can be particularly useful for selecting aptamer pairs targeting different binding sites and for the development of sandwich assays, thereby increasing the recognition potential of the targeted therapy system and improving the ability to distinguish HCC cells from healthy cells *in vivo*.

Study 3. Aptasensor development for therapeutic drug monitoring of vancomycin in serum

Aim / Objectives: The aim of this study was to demonstrate the recognition and binding capabilities of the previously selected Van-binding aptamer 8H (described in Study 1) in complex biological matrices, by integrating it into an electrochemical sensing platform designed for therapeutic drug monitoring (TDM) applications.

Materials and methods: The electrochemical aptasensor was fabricated using screen-printed gold electrodes on which the 8H aptamer was grafted via covalent Au-thiol bonds through multipulse amperometry-assisted technique. The surface was then blocked using an aromatic thiol, *p*-aminothiophenol (*p*-ATP), to displace the nonspecifically adsorbed DNA and fill the remaining free sites on the Au surface. The aptasensor fabrication process, platform optimization and aptamer-vancomycin interaction was electrochemically monitored by differential pulse voltammetry (DPV) using ferro/ferricyanide as a redox probe.

Results: The developed aptasensor was calibrated across the clinically relevant micromolar range (2.5 – 50 μM) commonly encountered in TDM, to accurately establish a signal-dose relationship suitable for POC applications. The cross-reactivity studies performed using several commonly co-administered pharmaceuticals in intensive care units (gentamicin, amoxicillin, acetaminophen) highlighted the selectivity of the aptamer towards Van, thus minimizing the risk of false-positive responses in complex biological media. The aptasensor was clinically validated using serum samples collected from hospitalized patients undergoing Van therapy. The results obtained after serum analysis using the electrochemical aptasensor showed a good correlation with those obtained by standard particle-enhanced turbidimetric inhibition immunoassay (PETINIA; $R^2=0.994$). These results indicate that the aptasensor has excellent capability for Van quantification in human serum, showing great promise as a viable and more rapid alternative for TDM directly at the bedside of hospitalized patients.

Conclusions: The Van-binding aptamer 8H was successfully employed for the development of an electrochemical aptasensor tailored for TDM applications. The aptasensor correctly stratified Van trough levels across the tested clinical samples, showing great potential for guiding drug dosing recommendations more rapidly (within

~ 40 min) than the currently employed methods in the hospital laboratory. Although this study was conducted on a limited cohort of patient samples, the results provide promising proof-of-concept for on-site TDM using aptamer-based electrochemical sensors.

Study 4. Aptamer and thioaromatic assembly as antifouling interface for food allergens

Aim / Objectives: This study aimed to develop a rapid, disposable and sensitive electrochemical aptasensor for the detection of food allergen Ara h1, that could aid in tackling the risks of peanut-induced allergic reactions and improve food safety monitoring.

Materials and methods: Various commercially available carbon and gold-based screen-printed electrodes were electrochemically characterized and optimized through gold nanoparticle deposition to choose the most suitable platform for aptasensor development. To immobilize the Ara h1-binding aptamer sequence two immobilization strategies were compared (backfilling vs. inserting method) and their influence on aptamer monolayer orientation, density and antifouling properties was assessed. An aromatic thiol (*p*-ATP) was used as blocking agent. The grafting of the *p*-ATP and Ara h1 aptamer on AuSPE was monitored by cyclic voltammetry, DPV and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). The electrochemical detection of Ara h1 protein was assessed indirectly by DPV and EIS in the presence of ferro/ferricyanide as a redox probe. The analytical parameters, including sensitivity, selectivity, stability and regenerability were systematically evaluated to determine the performance of the constructed aptasensor.

Results: The inserting approach, where the aptamer was immobilized within a pre-formed *p*-ATP monolayer, resulted in a higher signal change upon Ara h1 interaction than backfilling method. This highlighted the importance of *p*-ATP in promoting a uniform and controlled aptamer orientation due to its structural rigidity, while also efficiently blocking the surface and providing an antifouling effect. The aptasensor achieved satisfactory LODs by DPV (3.24 nM) and by EIS (14.08 nM), both below the clinically relevant threshold and demonstrated excellent selectivity against potential protein interferents commonly found in food matrices. Stability studies showed that the aptasensor retained 92.27 % \pm 0.27 % of its original response after 7 days of storage, confirming its suitability for extended use. Moreover, the sensing platform demonstrated regeneration capability via high ionic strength solution treatment, maintaining high sensitivity towards Ara h1 (102.1 % \pm 1.6 %). Finally, the aptasensor was successfully applied for the determination of Ara h1 in various beverages and food products with very good recovery rates (88.59 % - 112.1 %, RSD < 2.6 %).

Conclusions: A simple and rapid electrochemical aptasensor was developed for the detection of Ara h1 peanut allergen in food samples. The resulting disposable aptasensor offers a promising tool for POT detection, with the potential to reduce health risks and minimize the use of precautionary allergen labeling, thereby enhancing consumer safety and quality of life.

GENERAL CONCLUSIONS

Aptamers are versatile biorecognition elements that can be engineered through *in vitro* selection to exhibit certain specific properties tailored to their intended applications. Their high affinity and selectivity make them valuable tools for introducing specificity in various platform, such as disposable electrochemical aptasensors and targeted delivery systems.

This thesis investigated the diverse applications of aptamers and their significant potential in tackling critical global health challenges, including antibiotic resistance, cancer therapy and food safety. Thus, the research was focused on two main directions, the selection and characterization of aptamers using MBs-SELEX and the development of electrochemical aptasensors for POC and POT applications. In both research directions, aptamers were challenged to recognize various target molecules, from small chemical compounds to larger biomolecules.

In the first study, novel aptamers were successfully selected against Van, a glycopeptide antibiotic, using an optimized SELEX protocol designed to closely mimic physiological serum conditions. This approach enabled the isolation of aptamers capable of discriminating between structurally related analogs. SPR analysis identified aptamer 8H as the top-performing candidate, exhibiting improved binding affinity compared to the two previously reported aptamers from the literature. Furthermore, the three-dimensional structure of 8H aptamer was determined using the APTAMD protocol, enabling molecular docking simulations to reveal several potential models describing the binding mechanism between 8H aptamer and Van.

In the second study, novel DNA aptamers were selected targeting GPC3, a tumor biomarker of HCC, further demonstrating the versatility of MBs-SELEX for screening aptamers targeting both small and large molecules. Taking advantage of the multiple functional groups presented by a large protein target, various immobilization chemistries were employed to attach GPC3 to the solid support. This strategy resulted in the selection of distinct aptamer sequences with high affinities towards GPC3, which could be responsible of recognizing different epitopes of the protein. qPCR was integrated in the selection protocol to monitor the amplification process and assess the enrichment of GPC3-binding sequences. This enabled real-time evaluation of the

selection progress and aided in minimizing primer-dimer formation, a challenge previously observed during Van SELEX.

In the third study, the previously selected Van-binding aptamer 8H was successfully integrated into a disposable electrochemical aptasensor designed for TDM applications. The aptasensor was calibrated across a clinically relevant concentration range and validated using serum samples from hospitalized patients undergoing Van treatment. The aptasensor showed strong correlation with the standard PETINIA immunoassay used in clinical practice, demonstrating its potential to deliver rapid results and support drug dosing recommendations within 40 min.

The last study of this thesis explored the application of aptamers in the field of food safety through the development of a simple, rapid and sensitive electrochemical aptasensor for the detection of peanut allergen Ara h1. The study investigated the influence of various aptamer immobilization techniques and antifouling strategies on the recognition capability of the aptamer in complex food matrices. The optimized sensing platform enabled the detection of Ara h1 below the threshold concentration known to trigger allergic reactions, demonstrated excellent selectivity against potential protein interferents and was successfully applied to determine Ara h1 from multiple food products. The resulting disposable aptasensor offers a promising tool for POT detection for improving consumer safety and quality of life.

Overall, the studies presented in this thesis highlight the versatility and practical utility of aptamers incorporated into electrochemical sensors as alternative tools for rapid, sensitive and cost-effective analysis across a wide range of global health-related applications.

ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS OF THE DOCTORAL THESIS

The originality of this thesis consists in the comprehensive investigation of aptamers as biorecognition elements, starting from their in-lab screening via SELEX technology to the development of electrochemical sensing platforms and their application to aid global health challenges.

One key innovation of the thesis lies in the design and optimization of MBs-SELEX strategy for the *in vitro* selection of novel DNA aptamers targeting Van, a glycopeptide antibiotic used as first-line treatment of MRSA infection and GPC3, a tumor biomarker expressed on HCC cells. Both SELEX protocols were carefully tailored to closely mimic physiological conditions to ensure the success of aptamers in their intended applications. The designed selection strategies enabled the isolation of aptamers with higher affinities, even without any post-SELEX optimization, compared to the previously reported truncated Van or GPC3-binding aptamers.

Another element of innovation is represented by the integration of computational modeling into the aptamer selection protocol. In collaboration with researchers from University of Oviedo, the in-lab developed APTAMD protocol was successfully used to predict the three-dimensional structure of selected Van-binding aptamer and perform molecular docking studies. This provided valuable mechanistic insight into aptamer-target interaction, complementing experimental validation and supporting the rational design of post-SELEX modification studies, such as truncation and chemical functionalization, for further biosensing applications.

The thesis also demonstrates the successful translation of aptamers into functional biosensors. The selected Van-binding aptamer was incorporated into a disposable, low-cost and rapid electrochemical aptasensor for TDM of Van in clinical settings. The aptasensor was calibrated within the clinically relevant concentration range and validated using serum samples from hospitalized patients undergoing Van treatment. The aptasensor presented a strong correlation with the standard PETINIA immunoassay across the tested clinical samples, offering a rapid and cost-effective alternative for guiding drug dosing recommendations. In addition to the novelty of the newly identified DNA aptamer sequence, the developed platform represents the first clinically validated, label-free electrochemical aptasensor ever reported for Van TDM.

Another significant contribution was the development of a sensitive, fast and disposable electrochemical aptasensor, designed as an easy-to-use tool for quantitative allergen risk assessment in food products, without the need for complex extraction procedures. The aptasensor was successfully applied for Ara h1 peanut allergen monitoring in commercially available food products and is among the few electrochemical aptasensors reported in the literature for peanut allergy safety monitoring.

Collectively, the research presented in this thesis highlights the versatility and utility of aptamers as biorecognition elements in diverse global health related applications, including antibiotic monitoring, cancer therapy and food safety. By addressing both fundamental aspects of tailored aptamer selection and the practical development of aptasensors, this thesis bridges a significant gap between molecular design and real-world applications.

REFERENCES

1. Zaidan AM. The leading global health challenges in the artificial intelligence era. *Front Public Health*. 2023;11:1328918. doi: 10.3389/fpubh.2023.1328918.
2. Theuretzbacher U. The global resistance problem and the clinical antibacterial pipeline. *Nat Rev Microbiol*. 2025;23(8):491-508. doi: 10.1038/s41579-025-01169-8.
3. Melinte G, Hosu O, Cristea C, Marrazza G. DNA sensing technology a useful food scanning tool. *TrAC, Trends Anal Chem*. 2022;154:116679. doi: 10.1016/j.trac.2022.116679.
4. Gao F, Yin J, Chen Y, Guo C, Hu H, Su J. Recent advances in aptamer-based targeted drug delivery systems for cancer therapy. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022;10. doi: 10.3389/fbioe.2022.972933.
5. Ștefan G, Hosu O, De Wael K, Lobo-Castañón MJ, Cristea C. Aptamers in biomedicine: Selection strategies and recent advances. *Electrochim Acta*. 2021;376:137994. doi: 10.1016/j.electacta.2021.137994.
6. Ellington AD, Szostak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*. 1990;346(6287):818-822. doi: 10.1038/346818a0.
7. Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*. 1990;249(4968):505-510. doi: 10.1126/science.2200121.
8. Manea I, Casian M, Hosu-Stancioiu O, de-los-Santos-Álvarez N, Lobo-Castañón MJ, Cristea C. A review on magnetic beads-based SELEX technologies: Applications from small to large target molecules. *Anal Chim Acta*. 2024;1297:342325. doi: 10.1016/j.aca.2024.342325.
9. Szeitner Z, András J, Gyurcsányi RE, Mészáros T. Is less more? Lessons from aptamer selection strategies. *J Pharm Biomed Anal*. 2014;101:58-65. doi: 10.1016/j.jpba.2014.04.018.
10. Kohlberger M, Gadermaier G. SELEX: Critical factors and optimization strategies for successful aptamer selection. *Biotechnol Appl Biochem*. 2022;69(5):1771-1792. doi: 10.1002/bab.2244.
11. Gao S, Zheng X, Jiao B, Wang L. Post-SELEX optimization of aptamers. *Anal Bioanal Chem*. 2016;408(17):4567-4573. doi: 10.1007/s00216-016-9556-2.
12. Ni S, Zhuo Z, Pan Y, Yu Y, Li F, Liu J, et al. Recent Progress in Aptamer Discoveries and Modifications for Therapeutic Applications. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2021;13(8):9500-9519. doi: 10.1021/acsami.0c05750.
13. Díaz-Fernández A, Miranda-Castro R, de-los-Santos-Álvarez N, Rodríguez EF, Lobo-Castañón MJ. Focusing aptamer selection on the glycan structure of prostate-specific antigen: Toward more specific detection of prostate cancer. *Biosens Bioelectron*. 2019;128:83-90. doi: 10.1016/j.bios.2018.12.040.
14. Casian M, Manea I, Hosu-Stancioiu O, Lobo Castañón MJ, de-los-Santos-Álvarez N, Cristea C. Targeting hepatocellular carcinoma with aptamers: from biomarker detection to therapeutic applications. *TrAC Trends Anal Chem*. 2025;191:118346. doi: 10.1016/j.trac.2025.118346.
15. da Silva ETSG, Souto DEP, Barragan JTC, de F. Giarola J, de Moraes ACM, Kubota LT. Electrochemical Biosensors in Point-of-Care Devices: Recent Advances and Future Trends. *ChemElectroChem*. 2017;4(4):778-794. doi: 10.1002/celc.201600758.
16. Wu J, Liu H, Chen W, Ma B, Ju H. Device integration of electrochemical biosensors. *Nat Rev Bioeng*. 2023;1(5):346-360. doi: 10.1038/s44222-023-00032-w.