



Alessandro Bertucci^a, Alessandro Porchetta^b

<http://dx.medra.org/10.17374/CI.2026.108.3.62>

^aDipartimento di Scienze Chimiche, della Vita e della Sostenibilità Ambientale, Università di Parma

^bDipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, Università di Roma Tor Vergata
alessandro.bertucci@unipr.it, alessandro.porchetta@uniroma2.it

TECNOLOGIE A DNA PER LA DIAGNOSTICA DEL FUTURO

Le nanotecnologie a DNA permettono di progettare sistemi biomolecolari programmabili capaci di elaborare e trasmettere informazione. Integrate con piattaforme CRISPR, queste architetture consentono di convertire il riconoscimento di biomarcatori in segnali amplificati e misurabili. Ne emergono nuove strategie per la diagnostica avanzata, rapida, sensibili e adattabili a molteplici contesti applicativi.

La capacità di comunicare, elaborare e trasmettere informazioni è una proprietà fondamentale dei sistemi viventi. A livello cellulare, questa funzione è realizzata attraverso complesse reti di comunicazione biomolecolare, in cui proteine, acidi nucleici e piccole molecole interagiscono dinamicamente sviluppando processi decisionali, funzionali e adattativi. Tali reti possono essere interpretate come sistemi di elaborazione dell'informazione, in cui segnali molecolari vengono generati, trasmessi e decodificati secondo schemi organizzati, perfezionati nel corso dell'evoluzione. In questo senso, sebbene la comprensione della complessità funzionale cellulare sia ancora parziale, ogni cellula può essere descritta come un sistema computazionale chimico, capace di integrare input multipli e generare risposte specifiche attraverso circuiti biomolecolari interconnessi. Negli ultimi anni, il campo di ricerca delle nanotecnologie a DNA (*"DNA Nanotechnology"*) ha fornito strumenti senza precedenti per l'ingegnerizzazione di sistemi artificiali capaci di imitare e controllare i meccanismi molecolari alla base di questi processi. Grazie alla prevedibilità delle interazioni di appaiamento delle basi e alla possibilità di sintetizzare sequenze con elevata precisione e a basso costo, il DNA è stato utilizzato sia come un mezzo di calcolo e archiviazione dati, che come materiale ingegneristico per costruire dispositivi molecolari programmabili [1-5]. Alla base di tutti questi sistemi c'è la capacità del DNA di codificare l'informazione nella sequenza nucleotidica e nelle strutture secondarie e terziarie che essa può assumere, consentendo la

realizzazione di architetture dinamiche e in grado di rispondere a stimoli specifici. Di particolare interesse scientifico risulta la progettazione razionale di circuiti molecolari basati su acidi nucleici sintetici e reazioni di scambio di filamento (*"strand displacement reactions"*), in cui un input biomolecolare può attivare una cascata di eventi molecolari a valle, oppure più semplicemente essere convertito in un segnale di uscita quantificabile, realizzando una vera e propria trasduzione dell'informazione [6-8]. Un elemento chiave di questi sistemi è rappresentato dallo sviluppo di interruttori (*i.e.*, *switch*) molecolari basati su DNA, in grado di convertire eventi di riconoscimento molecolare in attivatori di questi processi biologici [9, 10]. Un approccio semplice per progettare questi *switch* sfrutta la possibilità di progettare stati conformazionali alternativi, in equilibrio tra loro e regolati da un preciso equilibrio termodinamico. La progettazione razionale dei parametri termodinamici alla base dell'equilibrio chimico consente di modulare la risposta del sistema in presenza dello specifico input, la sua finestra dinamica di concentrazioni misurabili e la velocità di risposta, rendendo possibile l'ottimizzazione per specifiche applicazioni bioanalitiche [11-13]. Tra i vari input biomolecolari, le proteine che legano il DNA (*DNA-binding proteins*, *DBPs*) rappresentano interfacce ideali per questo tipo di approcci, poiché riconoscono sequenze specifiche con elevata affinità e selettività. Il loro legame può indurre cambiamenti conformazionali nel DNA, stabilizzare strutture metastabili o promuovere la formazione di complessi multicomponente. Ad esempio, è stato



dimostrato che DBPs possono controllare processi biologici sintetici tramite l'azione su interruttori molecolari basati su DNA opportunamente ingegnerizzati, permettendo di creare reti di comunicazione biomolecolare artificiale [14]. Recentemente, il gruppo del Prof. Bertucci ha inoltre dimostrato che DPBs sono in grado di portare in prossimità sequenze di DNA separate, attivando reazioni di DNA *strand displacement*. In questi sistemi, la formazione del complesso proteina-DNA aumenta localmente la concentrazione efficace dei reagenti tramite un meccanismo di "prossimità indotta", accelerando la cinetica della reazione e consentendo l'attivazione di moduli funzionali a valle [15]. Questi sistemi permettono la costruzione di circuiti molecolari complessi, tra cui porte logiche (AND, OR) basate su input proteici, cascate gerarchiche enzimatiche e reti di comunicazione biomolecolare, oltre che lo sviluppo di piattaforme biosensoristiche avanzate. A tal proposito, l'integrazione di dispositivi programmabili a DNA con sistemi CRISPR-Cas rappresenta uno degli sviluppi più significativi degli ultimi anni. I sistemi CRISPR, biologicamente parte del sistema immunitario adattativo di batteri e archea, sono stati riprogrammati come strumenti per il riconoscimento specifico di acidi nucleici per applicazioni nel campo dell'editing genetico e, più recentemente, utilizzati anche come piattaforme avanzate in sensori biomolecolari [16-18]. Questo è stato possibile grazie ad alcuni enzimi CRISPR, come Cas12 e Cas13, i quali mostrano due specifiche e distinte attività di taglio indotte dal legame con la sequenza oligonucleotidica target: una prima attività di taglio sito specifica sulla sequenza bersaglio, ed una seconda attività collaterale in grado di degradare indiscriminatamente substrati nucleici circolanti, una volta avvenuto il riconoscimento del target. Questa attività collaterale nucleasi aspecifica può essere sfruttata in ambito bioanalitico per generare segnali amplificati: un singolo evento di riconoscimento può infatti attivare molteplici cicli catalitici, producendo un segnale facilmente rilevabile per via ottica o elettrochimica [19, 20]. La capacità di accoppiare il riconoscimento del target alla trasduzione catalitica del segnale è un grande vantaggio per lo sviluppo di piattaforme di analisi rapida e ultrasensibile, poiché dall'aggiunta di una mix di reazione alla matri-

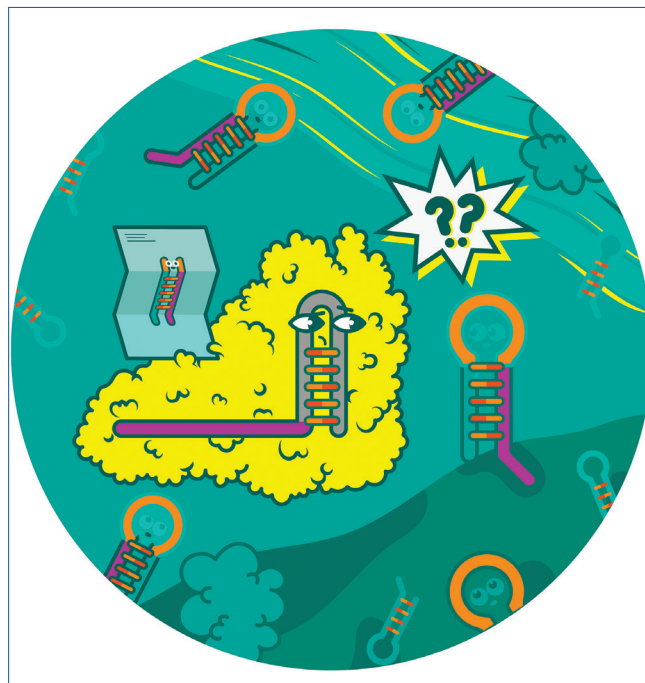


Fig. 1 - Descrizione animata di uno switch molecolare ingegnerizzato per non essere riconosciuto dal sistema enzimatico CRISPR-Cas12

ce contenente il target ("one-pot assay") è possibile rilevare in pochi minuti il segnale che dipende dalla presenza dell'analita di interesse. Per dimostrare la possibilità di estendere questo approccio a biomarcatori non oligonucleotidici, il gruppo del Prof. Porchetta ha ingegnerizzato dei nanointerruttori a DNA in grado di essere usati come moduli di controllo a monte dell'attività CRISPR. Questo ha permesso di collegare diversi input biomolecolari all'attivazione CRISPR. Tali sistemi sono basati su *hairpin* ingegnerizzati contenenti sequenze PAM, necessari per il riconoscimento da parte di Cas12a. In configurazione "OFF", il PAM è intrappolato all'interno della struttura secondaria; in presenza di un input, una reazione di *strand displacement* induce la conversione in una struttura duplex che espone il PAM e consente l'attivazione dell'enzima CRISPR-Cas12a. Questo meccanismo permette di trasformare input biomolecolari come proteine, anticorpi o piccole molecole, in attivazione CRISPR [21] (Fig. 1).

Approcci complementari sviluppati dal gruppo del Prof. Bertucci dimostrano come fattori di trascrizione possano controllare direttamente l'attività di Cas12 attraverso trasduttori molecolari basati

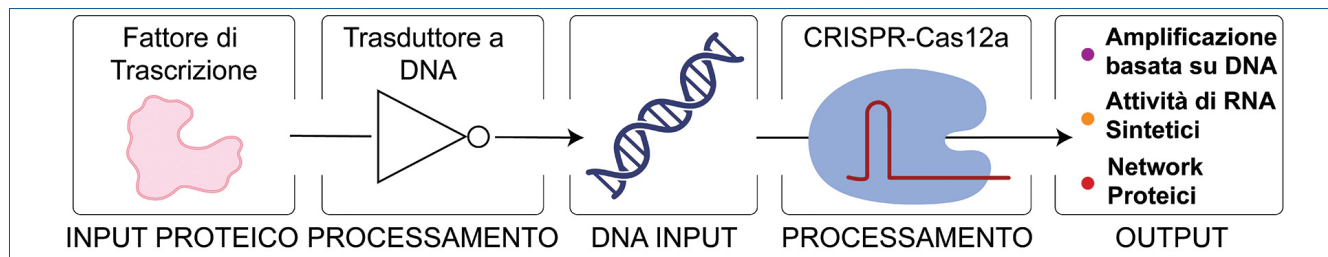


Fig. 2 - Schema grafico della progettazione di un sistema biologico sintetico in cui fattori di trascrizione possono regolare CRISPR-Cas12 tramite la mediazione di opportuni trasduttori a DNA

su strutture a DNA dinamiche. In questi sistemi, il legame del fattore di trascrizione stabilizza una configurazione che espone la sequenza target per Cas12, innescando l'attività di taglio collaterale responsabile della generazione del segnale fluorimetrico. La cascata risultante può essere ulteriormente accoppiata a sistemi CRISPR secondari (come Cas13), permettendo la costruzione di reti gerarchiche di trasmissione del segnale e l'implementare di funzioni complesse, come amplificazione multilivello o integrazione di segnali multipli [22] (Fig. 2).

Un'ulteriore strategia è rappresentata dall'implementazione di sistemi basati sul fenomeno della prossimità molecolare. Il legame simultaneo di due ligandi a una stessa proteina, come ad esempio una coppia di antigeni riconosciuti da un classico anticorpo bivalente, può essere utilizzato per indurre un significativo aumento locale della concentrazione efficace delle specie legate ("molarità effettiva"). Nel caso di ligandi coniugati a filamenti di DNA, questo processo risulta nell'attivazione di reazioni di ibridazione o di *strand displacement* che sarebbero altrimenti sfavorite a basse concentrazioni [23]. Strategie di questo tipo, in cui la formazione del complesso antigene-anticorpo funge

da input per reazioni a DNA e successiva trasduzione del segnale in uscita, sono state ad esempio utilizzate per sviluppare sensori per il rilevamento di anticorpi di interesse clinico [24-26]. In questo contesto si inserisce la piattaforma MARPLE (*Modular Antibody Recognition via Proximity-triggered Linker Exchange*), che rappresenta una recente evoluzione di questi concetti. In questo sistema, concepito e sviluppato congiuntamente dai due gruppi, l'interazione anticorpo-antigene è sfruttata per indurre una reazione di *strand displacement* che porta al rilascio di uno specifico filamento di RNA da una configurazione molecolare inattiva. Tale filamento, una volta libero, è in grado di attivare un sistema CRISPR-Cas13, la cui attività collaterale genera un segnale amplificato attraverso la degradazione di substrati fluorescenti. Grazie alla combinazione di effetto di prossimità indotta e amplificazione enzimatica, la piattaforma MARPLE raggiunge limiti di rilevazione nel basso femtomolare per varie classi di anticorpi, tra cui anticorpi monoclonali utilizzati in ambito terapeutico e auto-anticorpi indicatori dell'insorgenza di patologie oncologiche, mostrando eccellente compatibilità con matrici biologiche complesse come il siero umano [27] (Fig. 3).

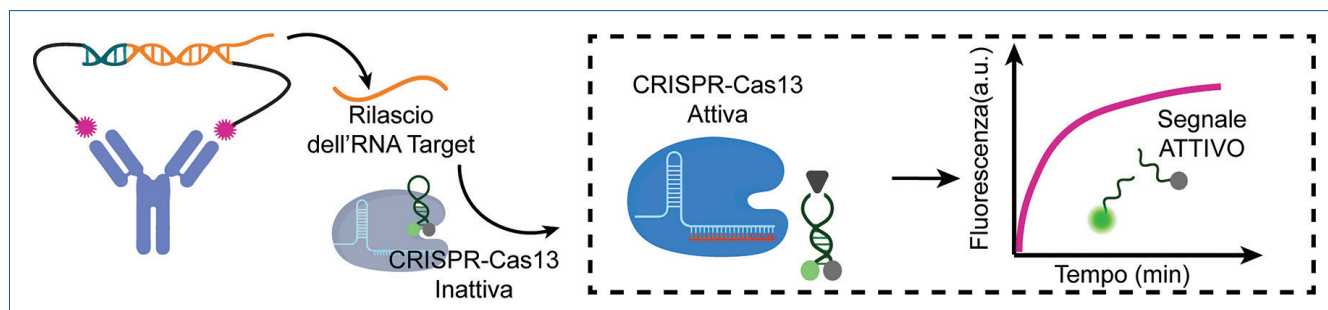


Fig. 3 - Illustrazione del principio di funzionamento della piattaforma MARPLE: l'interazione anticorpo-antigene determina il rilascio di uno specifico filamento di RNA in grado di attivare un sistema CRISPR-Cas13, la cui attività collaterale genera un segnale amplificato attraverso la degradazione di substrati fluorescenti

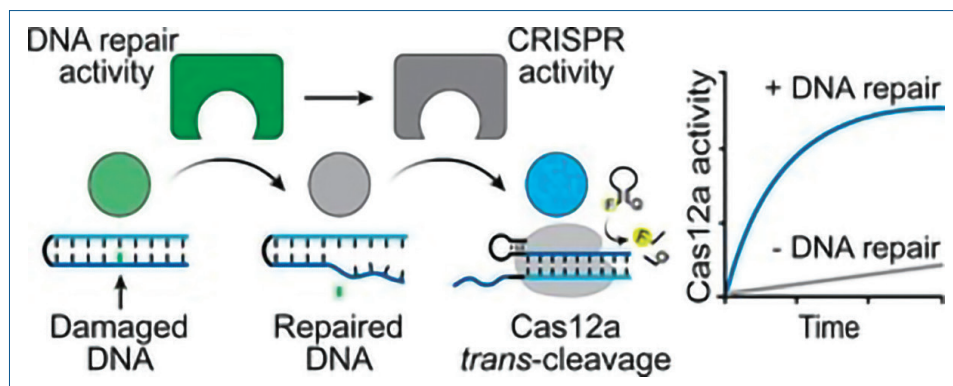


Fig. 4 - Strategia per la conversione rapida dell'attività enzimatica di tipo riparatoria del DNA ossidato ("Damaged DNA") in una trasduzione specifica di segnale ottico (fluorescenza). Il segnale è generato dall'attività di taglio collaterale aspecifica dell'enzima CRISPR-Cas12 solo in presenza di molecole reporter ("hairpin DNA")

Un altro esempio particolarmente significativo di comunicazione artificiale tra proteine e sistemi CRISPR-Cas è rappresentato dallo sviluppo di traduttori sintetici in grado di integrare direttamente l'attività enzimatica a monte nella trasduzione di segnali CRISPR. In questi sistemi, il DNA funge da substrato per enzimi coinvolti nei processi di riparazione del danno ossidativo, come alcune DNA glicosilasi. Il DNA è progettato per contenere lesioni chimiche che, una volta riconosciute ed elaborate dalla specifica glicosilasi, inducono una riconfigurazione strutturale del dispositivo. Questa transizione rende accessibile la sequenza target per Cas12a, attivandone l'attività nucleasica e la successiva amplificazione del segnale [28] (Fig. 4). Questo approccio consente di convertire direttamente l'attività enzimatica in un output amplificato. La modularità del design permette inoltre di adattare facilmente il sistema a diverse classi enzimatiche variando il tipo di lesione introdotta nel DNA. Nel complesso, questa strategia rappresenta un passo importante verso l'integrazione tra processi biochimici e piattaforme di *sensing* programmabili. In conclusione, l'integrazione tra nanotecnologie a DNA e sistemi CRISPR consente di sviluppare una nuova generazione di piattaforme bioanalitiche caratterizzate da elevata sensibilità, modularità e rapidità di risposta. Rispetto ai metodi tradizionali, come ELISA o saggi basati su amplificazione nucleica, questi sistemi offrono vantaggi significativi, tra cui la possibilità di eseguire rilevazioni in un singolo passaggio, la programmabilità della risposta, l'adattabilità a diverse classi di analiti e

l'integrazione in dispositivi miniaturizzati per diagnostica *point-of-care* [29, 30]. La possibilità di programmare eventi di comunicazione biomolecolare in maniera sempre più efficace apre quindi alla prospettiva di poter usufruire di sistemi sempre più sofisticati, in grado non solo di rilevare biomarcatori, ma anche di elaborare informazioni complesse a livello molecolare. Questa convergenza tra chi-

mica, biologia e ingegneria molecolare rappresenta una delle frontiere più promettenti della ricerca contemporanea, in cui la comunicazione biomolecolare diventa lo strumento chiave per costruire e generare nuove funzionalità.

BIBLIOGRAFIA

- [1] N.C. Seeman, H. Sleiman, *Nat. Rev. Mater.*, 2017, **3**, 17068.
- [2] D. Bar-Lev, O. Sabary *et al.*, *Nat. Comput. Sci.*, 2024, **4**, 813.
- [3] Y. Hu, C.M. Niemeyer, *Adv. Mater.*, 2019, **31**, 1806294.
- [4] S. Yang, B.W. Boegels *et al.*, *Nat. Rev. Chem.*, 2024, **8**, 179.
- [5] S. Jia, H. Lv *et al.*, *Nat. Rev. Bioeng.*, 2025, **3**, 535.
- [6] F.C. Simmel, B. Yurke *et al.*, *Chem. Rev.* 2019, **119**, 6326.
- [7] A. Amodio, B. Zhao *et al.* *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, **136**, 16469.
- [8] S. Fortunati, I. Vasini *et al.*, *Anal. Chem.*, 2022, **94**, 5075.
- [9] A. Vallée-Bélisle, F. Ricci *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009, **106**, 13802.
- [10] F. Ricci, A. Vallée-Bélisle *et al.*, *Acc. Chem. Res.*, 2016, **49**, 1884.
- [11] A. Porchetta, A. Vallée-Bélisle *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 13238.
- [12] A. Porchetta, A. Idili *et al.*, *Nano Lett.*, 2015, **15**, 4467.
- [13] F. Ricci, A. Vallée-Bélisle *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 15177.

- [14] A. Bertucci, A. Porchetta *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2020, **59**, 20577.
- [15] E. Spezzani, L. Capelli *et al.*, *ChemRxiv*, 2026, <https://doi.org/10.26434/chemrxiv-2026-nszs1>
- [16] J. van der Oost, E.R. Westra *et al.*, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2014, **12**, 479.
- [17] S. Chen, E. Ma *et al.*, *Science*, 2018, **360**, 436.
- [18] J.S. Gootenberg, O.O. Abudayyeh *et al.*, *Science*, 2017, **356**, 438.
- [19] M. Rossetti, R. Merlo *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 2022, **50**, 8377.
- [20] M.M. Kaminski. O.O. Abudayyeh *et al.*, *Nat. Biomed Eng.*, 2021, **5**, 643.
- [21] N. Bagheri, A. Chamorro *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2024, **136**, e202319677.
- [22] L. Capelli, S. Marzari *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2025, **147**, 21184.
- [23] M. Rossetti, A. Bertucci *et al.*, *Chem.-Eur. J.*, 2020, **26**, 9826.
- [24] M. Rossetti, S. Brannetti *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2020, **132**, 15083.
- [25] D. Di Lena, E. Sisti *et al.*, *Anal. Chem.*, 2025, **97**, 8195.
- [26] A. Porchetta, R. Ippodrino *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2018, **140**, 947.
- [27] E. Spezzani, L. Capelli *et al.*, *Adv. Sci.*, 2026, **13**, e17799.
- [28] N. Bagheri, A. Bertucci *et al.*, *ACS Sensors*, 2026, **11**, 1634.
- [29] S. Del Giovane, N. Bagheri *et al.*, *Trends Anal. Chem.*, 2024, **172**, 117594.
- [30] L. Capelli, E. Spezzani *et al.*, *Chem. Methods*, 2026, **6**, e202600005.

DNA Technologies for the Diagnostics of the Future

DNA nanotechnology enables the design of programmable biomolecular systems capable of processing and transducing information. When integrated with CRISPR platforms, these architectures convert biomarker recognition into amplified, measurable signals. This approach opens new strategies for advanced diagnostics that are rapid, sensitive, and adaptable to a wide range of applications.



Organo Ufficiale della Società Chimica Italiana

Da più di cento anni la rivista per chi si occupa di Chimica in Italia

Scarica la app gratuita per leggere
La Chimica e l'Industria
sui tuoi dispositivi elettronici

