

ARTICOLO

Matteo Scartoni

Laureato presso l'Università degli studi di Siena
Dottore magistrale in Biologia Sanitaria e Tecniche di Laboratorio Biomedico

Keywords:

CRISPR-Cas; Biologia Molecolare; Diagnosi

Corresponding author:

Matteo Scartoni

Email: scartonimatteo@gmail.com

Contributions:

the author(s) made a substantial intellectual contribution, read and approved the final version of the manuscript, and agreed to be accountable for all aspects of the work.

Conflict of interest:

the author(s) declare no potential conflict of interest.

Ethics approval and consent to participate:

not applicable.

Patient consent for publication:

not applicable.

Funding:

none.

Availability of data and materials:

data and materials are available from the corresponding author upon request.

Received: 2 September 2025

Accepted: 17 September 2025

DIAGNOSI DI BIOLOGIA MOLECOLARE CON CRISPR-CAS

ABSTRACT

Since its inception, molecular biology has undergone continuous advancements, driven by the imperative to meet the evolving demands of clinical practice with increasing precision and efficiency.

The emergence of personalized therapies has further underscored the need for diagnostic methodologies that are not only rapid and accurate but also highly performant.

Within this framework, the bacterial defense mechanism known as CRISPR-Cas discovered relatively recently has demonstrated exceptional versatility in both clinical and diagnostic applications. Its remarkable potential has attracted the attention of numerous research groups worldwide, who are actively investigating its integration into molecular diagnostics.

A key distinguishing feature of CRISPR-Cas lies in its programmability to target specific nucleotide sequences, offering a level of specificity that surpasses traditional restriction enzymes.

This capability renders it particularly suitable for the diagnosis of human genetic disorders, mitochondrial DNA alterations, and the detection of pathogenic microorganisms.

Although its application in diagnostics remains relatively novel, current studies have yielded highly promising results, highlighting tangible advantages over conventional techniques.

Consequently, it is reasonable to anticipate that, with continued research and technical refinement, healthcare professionals will soon have access to innovative molecular biology approaches capable of rapidly identifying targeted pathologies.

RIASSUNTO

Sin dalla sua nascita, la biologia molecolare è stata oggetto di continui aggiornamenti, necessari per rispondere in modo sempre più efficace alle crescenti esigenze del settore clinico.

In particolare, l'avvento delle terapie personalizzate ha accentuato la necessità di disporre di metodiche diagnostiche che siano al contempo rapide, precise e altamente performanti. In questo contesto, il sistema di difesa batterico CRISPR-Cas, scoperto relativamente di recente, ha dimostrato una notevole versatilità nell'ambito clinico e diagnostico.

Il suo straordinario potenziale ha attirato l'interesse di numerosi gruppi di ricerca a livello internazionale, che stanno esplorando le sue applicazioni nella diagnostica molecolare.

Una delle caratteristiche distintive di CRISPR-Cas è la possibilità di programmare il riconoscimento di specifiche sequenze nucleotidiche, rendendolo superiore ai tradizionali enzimi di restrizione.

Questa proprietà lo rende particolarmente adatto alla diagnosi di malattie genetiche umane, alterazioni del DNA mitocondriale e alla rilevazione di microrganismi patogeni.

Sebbene l'impiego di CRISPR-Cas in ambito diagnostico sia ancora relativamente recente, gli studi condotti finora hanno prodotto risultati estremamente promettenti, evidenziando vantaggi concreti rispetto alle metodiche convenzionali.

Pertanto, è ragionevole ipotizzare che, con il proseguimento della ricerca e l'ottimizzazione tecnica del sistema, nei prossimi anni i professionisti sanitari potranno avvalersi di approcci innovativi di biologia molecolare, capaci di identificare in tempi rapidi le patologie oggetto di indagine.

INTRODUZIONE

Nel corso degli anni, la diagnostica molecolare ha subito importanti e radicali mutazioni.

In poco tempo siamo passati da biotecnologie costose e poco performanti, a sistemi sempre migliori e ad alte prestazioni. Tecnologie come la *Polimerase Chain Reaction* (PCR), il *Next Generation Sequencing* (NGS) e i *Microarray*, sono oggi alla base dello studio del genoma nei principali centri diagnostici mondiali. Il loro impiego in microbiologia, virologia, oncologia e genetica medica viene considerato ovvio in paesi industrializzati e benestanti come l'Europa e gli Stati Uniti d'America, ma non lo è in quelli in via di sviluppo, dove la semplice presenza di energia elettrica non è sempre garantita.

Per tale motivo negli ultimi anni le biotecnologie stanno puntando sulla creazione di metodi diagnostici ad alta performance applicabili ovunque.

La scoperta del sistema *Clustered Regularly Interspersed Short Pallindromic Repeats Associated Proteins* (CRISPR-Cas) fatta nel 2012 da Jennifer Doudna ed Emmanuelle Charpentier,⁽¹⁾ ha

rivoluzionato non soltanto la terapia genica, ma anche gli approcci diagnostici di biologia molecolare. Tale scoperta, valse alle due ricercatrici il premio Nobel per la chimica nel 2020, ha già iniziato a cambiare la medicina di laboratorio in modo molto simile alla scoperta della PCR nel 1983 da K. Mullis. Oltre alle sue prime applicazioni nella terapia genica, nel corso del tempo il sistema CRISPR-Cas è entrato anche nel campo della diagnostica molecolare a basso costo, portando con sé enormi benefici. Proprio per sottolineare l'importanza di questa nuova tecnica diagnostica, nel seguente articolo ci concentreremo nella descrizione del funzionamento e sulle applicazioni odierne del sistema CRISPR-Cas nella diagnostica molecolare.

In natura il sistema CRISPR-Cas si localizza in specifici loci del genoma batterico e individuando acidi nucleici no-self, svolge la funzione di risposta immunitaria adattativa, attiva nelle infezioni da batteriofagi.

Durante la prima infezione virale, con la sopravvivenza del batterio e l'intervento di specifiche proteine, si memorizzano all'interno del complesso CRISPR batterico gli *spacer*, sequenze nucleotidiche virali di brevi dimensioni.

Queste sequenze separate da ripetizioni palindrome, si localizzano in prossimità di porzioni codificanti le proteine Cas, le quali, tra le varie funzioni hanno quella nucleasica, capace di generare un taglio preciso in prossimità dei *Protospacer Adjacent Motifs* (PAMs), neutralizzando così l'infezione virale in modo mirato.^{(2) (3)}

Con l'avanzamento delle ricerche, sono stati individuati tantissimi complessi CRISPR-Cas specifici per ogni specie batterica, così da rendere necessaria fin da subito una nomenclatura condivisa. I sistemi CRISPR-Cas, in base alle caratteristiche possedute, si dividono in due classi (I e II), ognuna delle quali è ulteriormente suddivisa in tipi differenti (classe I composta dal tipo I, III e IV, classe II composta dal tipo II, V e VI), suddivisibili a sua volta in sottotipi specifici.

Ogni sistema CRISPR elencato è costituito da più proteine Cas implicate in varie funzioni effettrici.

Ad esempio il sistema CRISPR-Cas CII e TII è principalmente composto dalla Cas 9, proteina multidominio con principale funzione di riconoscimento e scissione del DNA target. Tuttavia anche altre proteine come Cas 1 e 2 svolgono un ruolo chiave per il funzionamento complessivo del sistema.⁽²⁾

I sistemi più utilizzati in ambito biotecnologico sono quelli che possiedono le proteine Cas9, Cas12, Cas13 e Cas14, tutte con funzione di riconoscimento e clivaggio del DNA target e appartenenti ai sistemi di seconda classe (CII).⁽⁴⁾

La vera rivoluzione biotecnologica del sistema CRISPR-Cas è proprio intrinseca nella possibilità di programmazione del target molecolare, cioè nella capacità di riconoscere e tagliare l'esatta sequenza nucleotidica desiderata. Questa è la caratteristica essenziale che oltre a differenziare tale sistema dai classici enzimi di restrizione, ne conferisce una notevole utilità in campo terapeutico e diagnostico.

STRUTTURA E FUNZIONAMENTO DELLE PROTEINE Cas 9, 12 E 13

Come precedentemente illustrato, i sistemi maggiormente utilizzati in biotecnologia medica sono quelli di classe II, i quali, proprio per le loro caratteristiche determinate dalle proteine Cas contenute, sono ulteriormente suddivisibili in tipi differenti.

Il sistema CRISPR-Cas 9 (CII e TII) è composto principalmente dalla proteina multi dominio Cas 9, con funzione di scissione del DNA target e maturazione del crRNA e da altre proteine come Cas 1 e 2 implicate in altre importanti funzioni del sistema. La Cas 9 è una proteina bilobata composta da due domini specifici funzionali alla scissione.⁽⁴⁾ L'identificazione della zona di taglio avviene con il riconoscimento combinato tra DNA target, la guida di RNA creata (sgRNA) e la sequenza PAM composta da pochi nucleotidi. Questo riconoscimento altamente specifico determina un cambio conformazionale della proteina così da consentire la scissione (cis-attività) del DNA target.⁽³⁾

Questo sistema per l'assenza di attività di scissione collaterale (trans-attività), caratteristica tipica di Cas 12 e 13, viene meno applicato in campo diagnostico, ma risulta eccellente in terapia genica.

Il sistema CRISPR-Cas 12 (CII e TV) è composto principalmente dalla proteina effettrice Cas 12, implicata nel modulo di interferenza e clivaggio del DNA target e da altre proteine come Cas 1 e 2 essenziali per altre funzioni del sistema.

A livello strutturale Cas 12 è una proteina bilobata, composta da 1300 aminoacidi, divisa in un lobo NUC e REC aventi specifiche funzioni. In modo particolare, nel lobo NUC vediamo siti di riconoscimento delle sequenze PAM e i siti RUV di catalisi del filamento nucleotidico target. Anche in questo caso, una volta riconosciuto il DNA target mediante sgRNA e sequenza PAM, la Cas 12 effettua un cambio conformazionale in grado di attivare il sito catalitico deputato alla scissione del DNA target (cis-attività) e in questo caso anche il sito di taglio collaterale (trans-attività), necessario per l'esecuzione di tagli casuali su piccole molecole di DNA non bersaglio, caratteristica molto utile in campo diagnostico.⁽⁵⁾

Il sistema CRISPR-Cas 13 (CII e TVI) è composto principalmente dalla proteina effettrice Cas 13 con attività di riconoscimento e scissione dell'RNA a singolo filamento e da altre proteine come Cas 1 e 2 essenziali funzioni del sistema. Questa proteina composta da due domini a differenza delle altre è capace di riconoscere un target di RNA e scinderlo mediante cis-attività. Allo stesso tempo, come Cas 12, il cambio conformazionale del sito catalitico determina una attività di taglio collaterale su filamenti di DNA non bersaglio (trans-attività), caratteristica utile nella realizzazione dei test diagnostici.⁽²⁾

Nella seguente tabella (Tabella 1) si riassume le principali caratteristiche che contraddistinguono i tre sistemi CRISPR-Cas analizzati.⁽⁶⁾

TABELLA 1			
NOME	CAS-9	CAS-12	CAS-13
Bersaglio	dsDNA	dsDNA/ssDNA	ssRNA
Attività collaterale	Assente	Presente ssDNA	Presente ssDNA
Classe e tipo	CII e TII	CII e TV	CII e TVI

Tabella 1: Caratteristiche distintive dei tre sistemi CRISPR-Cas analizzati. Double strand DNA (dsDNA), single strand DNA (ssDNA) e single strand RNA (ssRNA).⁽⁶⁾

APPLICAZIONI DIAGNOSTICHE DEL COMPLESSO CRISPR-Cas

Ad oggi esistono vari sistemi di diagnostica molecolare che implementano la tecnologia CRISPR-Cas per la rilevazione di mutazioni genetiche umane o per identificare microrganismi in campioni.

Recentemente sono stati sviluppati sistemi sperimentali di diagnosi in vitro come SHERLOCK (*specific high-sensitivity enzymatic reporter unlocking*), sistema capace di rilevare molecole di DNA e RNA mediante l'uso di CRISPR-Cas 13.⁽⁷⁾ In modo simile CRISPR-Cas 12 viene applicato per vari scopi diagnostici in sistemi di rilevazione come DETECTR (*DNA Endonuclease Targeted CRISPR Trans Reporter*) e HOLMES (*One-Hour-Low cost Multipurpose highly Efficient System*).⁽⁸⁾

Il gruppo di ricerca di Ai et al. ha sviluppato un sistema di diagnostica molecolare basato su CRISPR-Cas 12 per *M. tuberculosis* denominato CRISPR-MTB. I ricercatori dopo attenta estrazione del DNA batterico dal campione mediante specifici protocolli e successiva amplificazione dell'estratto con tecnica

di *Recombinase Polymerase Amplification* (RPA), hanno inserito il complesso di identificazione CRISPR-Cas12 appositamente programmato per il riconoscimento della specifica sequenza genica batterica all'interno del campione.

Mediante la trans-attività precedentemente descritta e l'inserimento in reazione di ssDNA marcato con fluorocromi, Cas 12 ha determinato nei campioni positivi uno sviluppo di fluorescenza proporzionale alla quantità di target rilevato.⁽⁹⁾

In modo analogo Mukama et al. hanno creato un sistema di identificazione molecolare Cas 12 mediato per la rilevazione del gene aciltrasferasi di *P. aeruginosa*.

Dopo amplificazione dell'estratto mediante *Loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) e incubazione con sistema CRISPR-Cas 12 appositamente progettato, in 50 minuti è stato possibile rilevare il patogeno ricercato nei campioni mediante un test a flusso laterale.⁽⁸⁾

Analogamente, anche se con principi e meccanismi leggermente diversi, sono stati progettati test diagnostici in grado di rilevare *Salmonella enteritidis*, *A. baumannii*, *S. aureus* resistente alla meticillina (MRSA) ed *E. coli*.⁽¹⁰⁾

Come possiamo vedere, questi metodi diagnostici oltre a risultare altamente performanti, hanno tempi di esecuzione estremamente ridotti, costi contenuti e possiedono la capacità di poter essere applicati anche in assenza di strumentazione particolare, non sempre presente nelle varie parti del globo.

Nel corso del tempo sono stati realizzati studi dedicati a valutare l'applicabilità del sistema CRISPR-Cas nella diagnostica molecolare di varie malattie genetiche umane.

Ad esempio la distrofia miotonica di tipo 1 (DM1) è una malattia neuromuscolare impegnativa a livello diagnostico. Essa è determinata dalla ripetizione di triplette CTG anche per 2000 volte o più.

Come sappiamo, i metodi diagnostici ad oggi impiegati, come PCR e Southern Blotting, presentano varie limitazioni e costi spesso proibitivi.

Per ovviare a queste problematiche uno studio condotto da Asano et al. ha permesso di realizzare un sistema diagnostico basato su CRISPR-Cas 3, capace in tempi rapidi e con un costo moderato, di rilevare efficacemente tali ripetizioni.

È stato dimostrato che mediante questo approccio diagnostico, nonostante Cas 3 sia appartenente ad un sistema di classe I, è possibile identificare anche ripetizioni molto lunghe, altrimenti perse con i test convenzionali.⁽¹¹⁾

Altri studi, come quello condotto dal gruppo di ricerca di *Xu et al.* hanno combinato il sistema CRISPR-Cas 9 con il sequenziamento a nanopori per la diagnosi di ipercolesterolemia familiare (FH), malattia ereditaria autosomica molto spesso sottodiagnosticata. I sistemi di sequenziamento ad oggi utilizzati, mirano all'individuazione di piccole mutazioni, non rilevando correttamente le grandi mutazioni genetiche. Ad oggi più di 2100 varianti patogene sono associate alla FH nel gene del recettore delle LDL (LDLR).

Dopo aver attentamente progettato tutto il sistema sperimentale e aver svolto il sequenziamento dei casi in analisi, i ricercatori hanno elaborato i dati ottenendo risultati promettenti nell'applicazione della tecnologia CRISPR in questa patologia.⁽¹²⁾

Anche nel campo oncogenetico sono stati svolti vari studi relativi all'applicazione del sistema diagnostico CRISPR-Cas per la rilevazione di specifiche varianti geniche cancro correlate.

Secondo alcune ricerche condotte dal gruppo di ricerca di *Kohabir et al.*, mediante l'uso di un sistema CRISPR-Cas 12 appositamente progettato, è possibile rilevare varianti specifiche del gene TP53, principale oncosoppressore coinvolto nelle neoplasie maligne. In particolar modo il gruppo di ricerca è stato in grado di rilevare con successo la variante patogenetica missenso p.R273.

Anche in questo caso, per la rilevazione della mutazione, si sfrutta l'attività catalitica trans con successivo aumento di fluorescenza in caso di positività alla variante patogenetica ricercata.

Questo test molecolare applicato sperimentalmente in biopsie tissutali possiede promettenti applicazioni, che dovranno ovviamente essere approfondite con ulteriori test operativi.⁽¹³⁾

Un sistema simile è stato applicato nello studio di *Feng et al.* per la rilevazione di varianti del gene isocitrato deidrogenasi 1 (IDH1) nel glioma.

I ricercatori dopo aver estratto il DNA e amplificato il frammento desiderato, hanno aggiunto il sistema appositamente studiato CRISPR-Cas 12 nel

campione analizzato, il quale con meccanismo di scissione collaterale (trans-attività) ha determinato l'identificazione dei campioni positivi mediante sviluppo di fluorescenza.

IDH1, marcatore estremamente importante nel glioma, è strettamente associato alla prognosi e guida la strategia chirurgica. Per tale motivo, lo sviluppo di un test affidabile ma più rapido, risulta cruciale. Anche se dallo studio sono stati ottenuti solo risultati preliminari, si è mostrata una elevata sensibilità e specificità.⁽¹⁴⁾

Differentemente nello studio di *Qi et al.* per la rilevazione della variante L858R del gene codificante EGFR nel DNA circolante nel carcinoma polmonare non a piccole cellule, è stato impiegato il sistema CRISPR-Cas 14a, correlato ad amplificazione isoterma.⁽¹⁵⁾ Inoltre dallo studio condotto da *Cao et al.* è stato usato il sistema di amplificazione a cerchio rotante con il sistema CRISPR-Cas 12a per l'identificazione della variante H1047R di PIK3CA nel cancro al seno.⁽¹⁶⁾

Un ulteriore passo è stato fatto dal gruppo di ricerca di *Jiang et al.* il quale ha deciso di applicare il sistema CRISPR-Cas 13a per l'identificazione di mutazioni puntiformi a carico del DNA mitocondriale (mtDNA).

Dopo estrazione e amplificazione isoterma sono state rilevate in circa 90 minuti le varianti m.1492C>T e m.1555A>G del gene MTRNR1 implicate in specifiche patologie mitocondriali.⁽¹⁷⁾

Concludendo, in base alle ricerche fino ad oggi svolte, possiamo affermare che gli approcci diagnostici molecolari si stanno evolvendo.

In pochi anni siamo passati dalla scoperta della PCR, al sistema di editing genetico CRISPR-Cas, che sempre maggiormente prende spazio all'interno dei laboratori di tutto il mondo.

Anche se questa tecnologia diagnostica è agli albori e necessita ovviamente di ulteriori approfondimenti, con i dati ad oggi posseduti, rimane un approccio estremamente promettente ed economico, capace di lavorare senza attrezzature costose e personale qualificato e adatto quindi all'applicazione in qualsiasi parte del mondo.

Ad oggi il sistema CRISPR-Cas è fantascientifico quanto la PCR negli anni 70!!

Bibliografia

1. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., et al. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6096), 816–821.
2. Bhatia, S., Pooja, & Yadav, S. K. (2023). CRISPR-Cas for genome editing: Classification, mechanism, designing and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 238, 124054.
3. Jiang, F., & Doudna, J. A. (2015). The structural biology of CRISPR-Cas systems. *Current Opinion in Structural Biology*, 30, 100–111.
4. Koonin, E. v, Makarova, K. S., & Zhang, F. (2017). Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Current Opinion in Microbiology*, 37, 67–78.
5. Fu, W., Ma, J., Wang, Z., Tang, N., et al. (2025). Mechanisms and engineering of a miniature type V-N CRISPR-Cas12 effector enzyme. *Nature Communications*, 16(1), 5667.
6. Bonini, A., Poma, N., Vivaldi, F., Kirchhain, A., et al. (2021). Advances in biosensing: The CRISPR/Cas system as a new powerful tool for the detection of nucleic acids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 192, 113645.
7. Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Kellner, M. J., et al. (2018). Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *Science*, 360(6387), 439–444.
8. Mukama, O., Wu, J., Li, Z., Liang, Q., et al. (2020). An ultrasensitive and specific point-of-care CRISPR/Cas12 based lateral flow biosensor for the rapid detection of nucleic acids. *Biosensors and Bioelectronics*, 159, 112143.
9. Ai, J.-W., Zhou, X., Xu, T., Yang, M., et al. (2019). CRISPR-based rapid and ultra-sensitive diagnostic test for *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerging Microbes & Infections*, 8(1), 1361–1369.
10. Chakraborty, J., Chaudhary, A. A., Khan, S.-U.-D., Rudayni, H. A., et al. (2022). CRISPR/Cas-Based Biosensor As a New Age Detection Method for Pathogenic Bacteria. *ACS Omega*, 7(44), 39562–39573.
11. Asano, K., Yoshimi, K., Takeshita, K., Mitsuhashi, S., et al. (2024). CRISPR Diagnostics for Quantification and Rapid Diagnosis of Myotonic Dystrophy Type 1 Repeat Expansion Disorders. *ACS Synthetic Biology*, 13(12), 3926–3935.
12. Xu, S., Shiomi, H., Yamashita, Y., Koyama, S., et al. (2024). CRISPR-Cas9-guided amplification-free genomic diagnosis for familial hypercholesterolemia using nanopore sequencing. *PLOS ONE*, 19(3), e0297231.
13. Kohabir, K. A. V., Nooi, L. O., Brink, A., Brakenhoff, R. H., et al. (2023). In Vitro CRISPR-Cas12a-Based Detection of Cancer-Associated TP53 Hotspot Mutations Beyond the crRNA Seed Region. *The CRISPR Journal*, 6(2), 127–139.
14. Feng, Z., Kong, D., Jin, W., He, K., et al. (2023). Rapid detection of isocitrate dehydrogenase 1 mutation status in glioma based on Crispr-Cas12a. *Scientific Reports*, 13(1), 5748.
15. Qi, J., Qi, Q., Zhou, Z., Wu, Y., et al. (2024). PER-CRISPR/Cas14a system-based electrochemical biosensor for the detection of ctDNA EGFR L858R. *Analytical Methods*, 16(1), 51–61.
16. Cao, G., Chen, X., Deng, Y., Nie, F., et al. (2021). Single-nucleotide variant of PIK3CA H1047R gene assay by CRISPR/Cas12a combined with rolling circle amplification. *Analytica Chimica Acta*, 1182, 338943.
17. Jiang, H., Duan, K., Han, X., Wang, J., et al. (2021). Detection of Mitochondrial Mutations Through Isothermal Nucleic Acid Amplification Coupled With Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat-Associated Endonuclease Cas13a. *Frontiers in Genetics*, 11.

Publisher's note: all claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article or claim that may be made by its manufacturer is not guaranteed or endorsed by the publisher.
©Copyright: the Author(s), 2025