HeliTARGET: PNA di nuova generazione per contrastare l'infezione di *Helicobacter pylori* e di altri batteri patogeni

Razionale scientifico e obiettivi

La crescente diffusione delle resistenze antimicrobiche rende prioritario individuare approcci capaci di colpire bersagli diversi da quelli degli antibiotici convenzionali. HeliTARGET è nato con questo obiettivo, proponendo l'impiego di acidi nucleici peptidici (PNA) antisenso, molecole sintetiche in grado di appaiarsi in modo specifico agli RNA messaggeri e interferire con la traduzione. Per facilitare il loro ingresso nei batteri, i PNA vengono coniugati a peptidi veicolanti (bacterial-penetrating peptides, BPP). Il progetto prevedeva due linee sperimentali: lo sviluppo di coniugati diretti contro HP1043/HsrA, regolatore trascrizionale essenziale di *Helicobacter pylori* (AIM 1), e l'estensione dell'approccio al suo omologo CosR in *Campylobacter jejuni* (AIM 2). Entrambi regolano numerosi geni coinvolti in funzioni fisiologiche centrali ed essenziali. La prospettiva innovativa consiste nel colpire un singolo regolatore con potenziali conseguenze su più processi cellulari.

Risultati sperimentali principali: PNA antisenso anti-HP1043

Sono stati progettati e sintetizzati PNA di 8–11 basi diretti verso sequenze in prossimità della regione di legame del ribosoma e del codone di inizio dell'mRNA di *hp1043*. I coniugati con differenti BPP sono stati confrontati con molecole di controllo contenenti sequenze mismatch. In un sistema di traduzione cell-free, basato su un costrutto *hp1043*–GFP e sul sistema PURExpress, i PNA complementari hanno ridotto la produzione del reporter in modo dipendente dalla concentrazione, mentre i corrispettivi PNA con mismatch non hanno mostrato una riduzione apprezzabile della traduzione del reporter anche alla massima concentrazione testata. L'inibizione è stata ulteriormente supportata da analisi immunologiche della proteina prodotta in vitro (**Figura 1**).

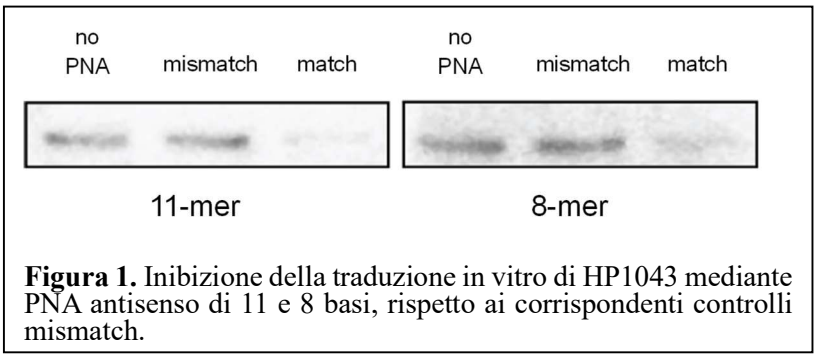

Figura 1. Inibizione della traduzione in vitro di HP1043 mediante PNA antisenso di 11 e 8 basi, rispetto ai corrispondenti controlli mismatch.

L'effetto sulla vitalità batterica è stato valutato nei ceppi G27 e 26695 di *H. pylori* mediante determinazione delle concentrazioni minime inibenti (MIC) e battericide (MBC). Il coniugato più efficace, identificato come 6124 e contenente un PNA di 10 basi, ha mostrato MIC di 8 μM nel ceppo G27 e 4 μM nel ceppo 26695, con MBC di 8 μM in entrambi (**Tabella 1**). Il controllo mismatch 6126 non ha inibito la crescita nell'intervallo testato (MIC >32 μM). Il confronto indica che l'effetto antibatterico non è spiegato semplicemente dalla presenza del peptide veicolante. PNA disegnati in regioni limitrofe hanno mostrato un minore effetto, indicando la necessità di ottimizzare la regione target di appaiamento tra PNA e mRNA.

BPP-PNA conjugates			*H. pylori* G27	*H. pylori* 26695
No.	BPP	Target Position (ref. start codon)	MIC (MBC) [µM]	MIC (MBC) [µM]
6124	H-(dR- eg1)$_6$ **MATCH**	from -6 to +4	8 (8)	4 (8)
6126	H-(dR- eg1)$_6$ **MISMATCH**	from -6 to +4	> 32 (> 32)	> 32 (> 32)
6125	H-(dR- eg1)$_6$ **MATCH**	from -5 to +4	16 (16)	8 (16)
6127	H-(dR- eg1)$_6$ **MISMATCH**	from -5 to +4	32 (> 32)	> 32 (> 32)

Tabella 1. Concentrazioni minime inibenti (MIC) e battericide (MBC) dei coniugati PNA anti-HP1043 nei ceppi G27 e 26695 di *H. pylori*.

Per verificare il coinvolgimento del bersaglio molecolare, è stata misurata la quantità intracellulare di HP1043 mediante immunoblotting. Nel ceppo G27, il trattamento con il coniugato specifico 6124 a 16 µM ha determinato una marcata diminuzione della proteina (**Figura 2**), non osservata con il mismatch 6126, permettendo di associare l'inibizione della traduzione dell'mRNA di *hp1043*, la riduzione dei livelli della proteina HP1043 e attività antibatterica, fornendo una prova di principio dell'utilizzo di un regolatore essenziale come bersaglio di PNA antisenso. Le prove di uptake confermano l'importanza del delivery, che rimane un fattore limitante e meritevole di ottimizzazione.

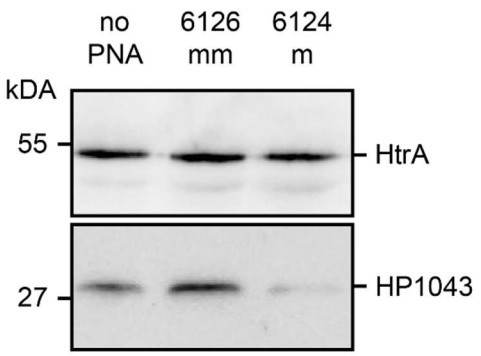

Figura 2. Riduzione dei livelli intracellulari di HP1043 nel ceppo G27 trattato con PNA 6124 (16 µM), rispetto al mismatch 6126 (32 µM) e al controllo non trattato. HtrA: controllo di carico.

Per *C. jejuni*, le attività scientifiche complementari hanno riguardato la caratterizzazione genomica e biochimica del regolatore CosR, con l'obiettivo di definirne i bersagli diretti e approfondirne il ruolo nella fisiologia batterica. Queste conoscenze contribuiscono a rafforzare il razionale biologico per il futuro sviluppo di strategie antisenso dirette contro CosR.

Prodotti scientifici e disseminazione

Le attività di ricerca hanno contribuito alla produzione di tre manoscritti scientifici, attualmente in differenti fasi del processo editoriale:

- Antoniciello F., Japoni-Nejad A., Vannini A., Chiti E., Scarlato V., Nielsen P.E., Roncarati D. *Development of antisense-PNA targeting the essential transcriptional regulator HP1043 mRNA of the major human pathogen Helicobacter pylori.* Manoscritto in preparazione, che rappresenta il principale prodotto sperimentale direttamente riconducibile agli obiettivi di HeliTARGET. Il contributo della Fondazione del Monte sarà esplicitamente riconosciuto nella sezione dedicata ai finanziamenti.

- Chiti E., Odorici T., Noszka M., Muraszko J., Zannoni A., Zawilak-Pawlik A., Vannini A., Roncarati D. *Genome-wide CosR binding reveals core physiological targets and oxidative stress-dependent remodeling in Campylobacter jejuni. Manoscritto in revisione presso Communications Biology.* Il lavoro contribuisce alla caratterizzazione del regolatore essenziale CosR, bersaglio del secondo obiettivo progettuale, approfondendone le funzioni biologiche e le reti regolatorie. Il contributo della Fondazione del Monte è esplicitamente riconosciuto nella sezione dedicata ai finanziamenti.
- Vannini A., Chiti E., Manna C., Li Volsi M.N., Roncarati D. *When two components are not two: signal routing beyond canonical bacterial two-component systems.* Review sottoposta a Critical Reviews in Microbiology, che approfondisce i meccanismi non canonici della regolazione batterica, inclusi i regolatori orfani come HP1043 e CosR. Il contributo della Fondazione del Monte è esplicitamente riconosciuto nella sezione dedicata ai finanziamenti.

I risultati della linea di ricerca sono stati inoltre presentati in importanti congressi scientifici internazionali. In particolare, Roncarati D., Antoniciello F., Japoni-Nejad A., Nielsen P.E., Vannini A., Chiti E., Chiappori F., Scarlato V. hanno presentato la comunicazione orale "*Innovative multi-targeting strategies against antibiotic-resistant Helicobacter pylori: inhibiting the crucial regulator HP1043*" al 18th Congress of the International Union of Microbiological Societies (IUMS), Firenze, 23–25 ottobre 2024.

Ulteriori risultati sono stati presentati attraverso quattro poster congressuali, tre al FEMS MICRO 2025 (Milano) e uno all'EMBL 2025 (**vedi allegato**). Le comunicazioni hanno riguardato sia lo sviluppo di strategie antimicrobiche dirette contro HP1043, sia ricerche complementari sui meccanismi di regolazione genica e sull'organizzazione del cromosoma di *H. pylori*. Il sostegno della Fondazione del Monte è stato riconosciuto nei materiali congressuali, contribuendo alla visibilità del finanziamento nel contesto della comunità scientifica internazionale.

Limiti e prospettive

HeliTARGET ha prodotto risultati sperimentali solidi sul bersaglio HP1043: identificazione di coniugati attivi, evidenze del loro meccanismo antisenso e misurazione di un effetto antibatterico in colture di due ceppi di *H. pylori*. Restano da approfondire il delivery in condizioni più vicine all'ambiente gastrico e la selettività verso altri microrganismi.

Le evidenze ottenute individuano un candidato e una strategia suscettibili di ulteriore ottimizzazione. Le competenze e le infrastrutture del gruppo dell'Università di Bologna, insieme alla collaborazione internazionale sulla tecnologia PNA, consentono di proseguire la caratterizzazione della piattaforma e di pianificare successive verifiche di efficacia, specificità e sicurezza, subordinatamente alla disponibilità di risorse aggiuntive.