

Progetto di Ricerca

Analisi molecolare delle basi patogenetiche della Crioglobulinemia Mista associata all'infezione da Virus dell'Epatite C

Responsabile: Prof.ssa Anna Linda Zignego, Centro manifestazioni Sistemiche da Virus Epatitici, Università degli Studi di Firenze

BASE SCIENTIFICA

L'infezione da virus dell'epatite C (HCV) è diffusa in tutto il mondo con una prevalenza particolarmente elevata in alcune aree geografiche tra le quali spiccano le regioni mediterranee^{1,2}, causando gravi patologie epatiche culminanti nella cirrosi e nel carcinoma epatocellulare. Secondo recenti analisi epidemiologiche, i portatori di HCV nel mondo sarebbero oltre 170 milioni, di cui almeno due in Italia; ciò rende l'infezione da HCV uno dei principali e più urgenti problemi di salute pubblica nel nostro paese e nel mondo³⁻⁵. Il nostro gruppo ha precedentemente mostrato come l'HCV infetti non solo gli epatociti, ma anche cellule del sistema immunitario e preferenzialmente i linfociti B⁶⁻⁸. Questo duplice tropismo si riflette anche nei risvolti patogenetici e clinici dell'infezione; infatti, la presenza di markers HCV è strettamente correlata con numerosi disordini autoimmuni/linfoproliferativi (DLP), tra i quali spiccano per la Crioglobulinemia Mista (CM), il linfoma non-Hodgkin (LNH) a cellule B e le gammopatie monoclonali^{7,9-18}.

Si tratta di forme di natura autoimmune e/o linfoproliferativa che coinvolgono preferibilmente il compartimento B linfocitario, di cui la CM è considerata il prototipo. Questa è di fatto la manifestazione extraepatica da HCV per la quale è disponibile il maggior numero di dati e per la quale il legame patogenetico con l'infezione è oggi praticamente indiscusso dato che la presenza di markers HCV è riscontrabile in oltre il 90% dei soggetti con CM^{7,19-22}. La CM è caratterizzata dalla presenza di immunocomplessi circolanti secondari ad un disordine linfoproliferativo che vede l'espansione oligo o monoclonale di linfociti B che producono IgM ad attività di fattore reumatoide (IgM-FR); tali immunoglobuline, infatti, hanno affinità per la regione costante delle IgG originando complessi di grosso peso molecolare che tendono a precipitare a bassa temperatura. Tali immunocomplessi, definiti crioglobuline (CG), sono alla base delle manifestazioni cliniche della CM che sono l'espressione di una vasculite sistemica coinvolgente vari organi ed apparati. Questa ha notevoli ripercussioni sulla qualità di vita dei pazienti potendo manifestarsi con quadri di gravità variabile, da un complesso di astenia, porpora declive e artalgie a forme gravemente invalidanti caratterizzate da compromissione renale e pluriorganica, ulcere cutanee e neuropatie periferiche e centrali, nonché dall'evoluzione verso forme francamente neoplastiche. Relativamente a tale ultimo punto, di fatto, la CM è considerata un disordine

linfoproliferativo di natura generalmente benigna, ma, comunque, a carattere pre-linfomatoso con possibile evoluzione verso un franco LNH a cellule B in una percentuale non trascurabile di casi (8-10%)⁸. Il carattere linfoproliferativo della CM è confermato da caratteristiche quali un'espansione clonale di linfociti B IgMk+ nel sangue periferico e la presenza nel fegato e nel midollo osseo di infiltrati linfoidi con aspetti del tutto assimilabili a quelli di taluni LNH²³. L'ipotesi del potenziale linfomagenetico dell'HCV è stata avvalorata da numerose osservazioni, includenti la recente dimostrazione di una stretta associazione tra infezione HCV e il linfoma splenico a linfociti villosi (SLVL) associato alla CM²⁴.

Numerosi studi hanno cercato di caratterizzare da un punto di vista sia genetico che molecolare le cellule che producono le IgM-FR, ma con risultati soltanto parziali^{25,26}. Sembra attualmente definito che tali molecole siano contraddistinte dalla presenza di geni per la regione variabile delle catene pesanti del tipo VH1-69, mentre per quanto riguarda la specificità della parte legante l'antigene, i dati sono frammentari e l'ipotesi che tali anticorpi mostrino affinità per epitopi virali sembra la più coerente. Questa ipotesi sembra supportata dal fatto che l'eliminazione del virus grazie ad efficace terapia antivirale è generalmente accompagnata dalla scomparsa delle CG e della sintomatologia ad esse relata. Purtroppo l'assenza, fino a pochi anni or sono, di un efficace sistema di replicazione e produzione del virus in-vitro, ha notevolmente rallentato i progressi della ricerca in tale campo. Recentemente è stato messo a punto un sistema di replicazione dell'HCV in colture di cellule di tipo epatocitario; tale modello è basato sull'uso di RNA sintetici, definiti repliconi, in cui il genoma dell'HCV è posto sotto il controllo di promotori esterni, mentre l'espressione di un gene di selezione (neomicina fosfotransferasi) è guidata dalle sequenze regolatorie virali²⁷. Tale sistema consente la produzione delle proteine virali, la replicazione dell'HCV-RNA e nelle versioni più evolute (JFH-1), anche la produzione e secrezione di virioni infettivi.

Al fine di riuscire ad identificare delle misure terapeutiche efficaci nei confronti della CM-HCV correlata, una tappa fondamentale sarà rappresentata dalla caratterizzazione molecolare dei cloni B cellulari produttori delle IgM-FR (B-FR) e parallelamente dalla definizione delle regioni del virus responsabili (in circa la metà dei pazienti con infezione HCV) della stimolazione ed espansione di tali tipi cellulari. Infatti, sono stati compiuti enormi progressi nel campo delle terapie biologiche cioè basate su anticorpi monoclonali diretti contro specifiche popolazioni cellulari responsabili di varie patologie sia degenerative che neoplastiche; si può quindi ipotizzare, una volta definiti i corretti bersagli molecolari, di applicare un simile approccio anche per il controllo dei cloni B-FR e quindi della sindrome crioglobulinemica.

OBIETTIVI

In questo contesto, il nostro progetto di ricerca ha come obiettivi principali l'identificazione, l'isolamento e la coltura in-vitro delle cellule B-FR provenienti da soggetti con CM-HCV correlata, passaggi necessari per giungere alla loro completa caratterizzazione sia da un punto di vista genetico che immunofenotipico;

parallelamente, grazie alla disponibilità di tale modello, saranno identificati, utilizzando proteine ricombinanti, i possibili epitopi virali responsabili dell'espansione delle popolazioni B-FR. Inoltre, grazie all'acquisizione del modello di replicazione in-vitro del virus dell'epatite C (replicone JFH-1, gentilmente concesso dal Dr. Wakita, National Institute for Infectious Diseases, Tokio) sarà possibile valutare l'azione della particella virale purificata nell'attivazione dei linfociti autoreattivi B-FR.

L'assenza di un vaccino protettivo, la spiccata tendenza ad instaurare un'infezione cronica e indurre patologie severe nell'uomo obbligano i ricercatori che studiano l'HCV ad utilizzare misure protettive e di contenimento di livello 3. Il presente progetto, che prevede lo svolgimento di varie fasi della ricerca a diretto contatto con virioni infettivi (vedi il dettaglio nel programma di ricerca), potrà essere effettuato grazie alla disponibilità di laboratori specificamente attrezzati a garantire un livello di sicurezza contro il rischio biologico di tipo 3, presenti presso il Dipartimento di Sanità Pubblica dell'Università degli Studi di Firenze.

BIBLIOGRAFIA

1. Brechot C. Hepatitis B and C viruses and primary liver cancer. *Baillieres Clin Gastroenterol.* 1996;10:335-373.
2. Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med.* 2001;345:41-52.
3. Wasley A, Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. *Semin Liver Dis.* 2000;20:1-16.
4. Bellentani S, Miglioli L, Masutti F, Saccoccio G, Tiribelli C. Epidemiology of hepatitis C virus infection in Italy: the slowly unraveling mystery. *Microbes Infect.* 2000;2:1757-1763.
5. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol.* 2007;13:2436-2441.
6. Zignego AL, Macchia D, Monti M, et al. Infection of peripheral mononuclear blood cells by hepatitis C virus [see comments]. *J Hepatol.* 1992;15:382-386.
7. Zignego AL, Ferri C, Monti M, et al. Hepatitis C virus as a lymphotropic agent: evidence and pathogenetic implications. *Clin Exp Rheumatol.* 1995;13 Suppl 13:S33-37.
8. Zignego AL, Brechot C. Extrahepatic manifestations of HCV infection: facts and controversies. *J Hepatol.* 1999;31:369-376.
9. Ferri C, La Civita L, Monti M, et al. Can type C hepatitis infection be complicated by malignant lymphoma? [letter; comment]. *Lancet.* 1995;346:1426-1427.
10. Ferri C, La Civita L, Zignego AL. Extrahepatic manifestations of hepatitis C virus infection [letter; comment]. *Ann Intern Med.* 1996;125:344; discussion 346.
11. Andreone P, Zignego AL, Cursaro C, et al. Prevalence of monoclonal gammopathies in patients with hepatitis C virus infection. *Ann Intern Med.* 1998;129:294-298.
12. Zignego AL, Ferri C, Giannini C, et al. Hepatitis C virus infection in mixed cryoglobulinemia and B-cell non-Hodgkin's lymphoma: evidence for a pathogenetic role. *Arch Virol.* 1997;142:545-555.
13. Zignego AL, Ferri C, Innocenti F, et al. Lack of preferential localization of tumoral mass in B-cell non-Hodgkin's lymphoma associated with hepatitis C virus infection [letter]. *Blood.* 1997;89:3066-3068.
14. Ferri C, La Civita L, Caracciolo F, Zignego AL. Non-Hodgkin's lymphoma: possible role of hepatitis C virus [letter]. *Jama.* 1994;272:355-356.
15. Ferri C, Pileri S, Zignego AL. Hepatitis C virus infection and non-Hodgkin's lymphoma. In: Geodert J, (NIH) NCI, eds. *Infectious causes of cancer Targets for intervention.* Totowa, New Jersey: The Human Press inc.; 2000:349-368.
16. Ferri C, Caracciolo F, La Civita L, et al. Hepatitis C virus infection and B-cell lymphomas [letter]. *Eur J Cancer.* 1994;10:1591-1592.

17. Ferri C, La Civita L, Longombardo G, Cecchetti R, Giannini C, Zignego AL. Type C chronic hepatitis complicated by B-cell lymphoma [letter]. *Am J Gastroenterol.* 1995;90:2071-2072.
18. Ferri C, La Civita L, Monti M, et al. Chronic hepatitis C and B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Qjm.* 1996;89:117-122.
19. Ferri C, La Civita L, Longombardo G, et al. Hepatitis C virus in mixed cryoglobulinemia and B cell lymphoma [letter]. *Clin Exp Rheumatol.* 1994;12:89-90.
20. Ferri C, Monti M, La Civita L, et al. Hepatitis C virus infection in non-Hodgkin's B-cell lymphoma complicating mixed cryoglobulinaemia. *Eur J Clin Invest.* 1994;24:781-784.
21. Ferri C, La Civita L, Caracciolo F, Bellesi G, Zignego AL. Hepatitis C virus and lymphoproliferative disorders [letter]. *Blood.* 1996;88:4730-4731.
22. Zignego AL, Ferri C, Giannelli F, et al. Prevalence of bcl-2 rearrangement in patients with hepatitis C virus-related mixed cryoglobulinemia with or without B-cell lymphomas. *Ann Intern Med.* 2002;137:571-580.
23. Ferri C, Zignego AL, Pileri S. Cryoglobulins. 'Clinical Hematology'. Vol. Chapter 24: Elsevier (Mosby); 2005:625-636.
24. Hermine O, Lefrere F, Bronowicki JP, et al. Regression of splenic lymphoma with villous lymphocytes after treatment of hepatitis C virus infection. *N Engl J Med.* 2002;347:89-94.
25. De Re V, De Vita S, Marzotto A, et al. Sequence analysis of the immunoglobulin antigen receptor of hepatitis C virus-associated non-Hodgkin lymphomas suggests that the malignant cells are derived from the rheumatoid factor-producing cells that occur mainly in type II cryoglobulinemia. *Blood.* 2000;96:3578-3584.
26. Agnello V, Zhang QX, Abel G, Knight GB. The association of hepatitis C virus infection with monoclonal rheumatoid factors bearing the WA cross-idiotype: implications for the etiopathogenesis and therapy of mixed cryoglobulinemia. *Clin Exp Rheumatol.* 1995;13 Suppl 13:S101-104.
27. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med.* 2005;11:791-796.

MODALITÀ DI ATTUAZIONE DEL PROGETTO

Il progetto sarà articolato in due fasi principali, ciascuna della durata di circa 12 mesi, che saranno strutturate come segue: durante la prima fase verranno prodotti gli strumenti ed il modello sperimentale necessari per raggiungere gli obiettivi, mentre durante la seconda fase si analizzeranno i meccanismi di interazione tra virus e cellula che portano alla sua espansione incontrollata. L'utilizzazione del laboratorio BSL-3 si renderà necessaria, nella la fase 1, per gli esperimenti descritti ai punti 2, 3, 5 e 6, mentre nella seconda fase per quelli al punto 9 e 10.

FASE 1

1) Reclutamento e selezione dei soggetti con CM HCV-correlata

La selezione dei soggetti con infezione da HCV e CM sarà effettuata dallo staff medico del Centro MaSVE, diretto dalla Prof.ssa Zignego; saranno scelti i soggetti con alti livelli di crioglobuline nel siero e con i tratti caratteristici della patologia. Verranno esclusi tutti i pazienti con MC in cui si riscontrino altri disordini autoimmuni o linfoproliferativi. Verranno effettuati prelievi di sangue periferico e quando possibile, di sangue midollare.

2) Separazione PBMC e isolamento dei linfociti B

Da prelievi di sangue periferico (circa 30 ml) o sangue midollare (5-10 ml) saranno isolate le cellule mononucleate (PBMC) tramite precipitazione su gradiente di densità. Le cellule saranno lavate 2 volte e i linfociti B saranno isolati tramite separazione immunomagnetica utilizzando delle sfere magnetiche rivestite di anticorpi anti-CD19 (MACS, Miltenyi Biotec).

3) Generazione di linee cellulari B linfocitarie policlonali

Le cellule B isolate verranno immortalizzate tramite coltura in presenza di medium condizionato delle cellule B95-8 (30%) produttrici di EBV. La coltura sarà effettuata in presenza di PBMC allogene irradiate e di CpG2006 (oligonucleotide attivatore del toll-like receptor 9). Questa fase sarà effettuata in collaborazione con la Dr.ssa Traggiai dell'Istituto Gaslini di Genova, la quale ha sviluppato la metodologia per l'efficace immortalizzazione dei linfociti B (Traggiai et al Nat. Med, 2004; Science 2004). Dopo circa 3 settimane di coltura le popolazioni policlonali immortalizzate saranno testate per la secrezione di IgM-FR tramite un test ELISA messo a punto nel nostro laboratorio.

4) Selezione dei cloni produttori di IgM-FR

I cloni produttori di anticorpi autoreattivi saranno identificati tramite diluizione limite, valutando con test ELISA la presenza di tali anticorpi nel medium di coltura. I cloni con più alti livelli di secrezione di IgM-FR saranno amplificati e caratterizzati tramite citofluorimetria.

5) Coltura e trasfezione della linea epatocitaria HuH7.5 con il replicone HCV JFH-1

La linea epatocitaria HuH7.5 è la sola linea cellulare che consenta l'automantenimento dei repliconi HCV con replicazione dell'HCVRNA, produzione delle proteine virali e secrezione di particelle infettive in-vitro. Al fine di ottenere medium condizionato contenente particelle virali complete, RNA del replicone JFH-1 verrà trasfettato nelle cellule HuH7.5 utilizzando come vettori dei liposomi cationici (Lipofectamina, Invitrogen). L'efficienza di trasfezione con questo sistema è risultata di circa 50-60%. I cloni di cellule produttrici saranno isolabili dopo circa 10-15 giorni di coltura in medium selettivo (500ng/ml G418).

6) Valutazione della produzione intracellulare e nel medium di coltura di virioni HCV

Le cellule alberganti il replicone JFH-1 saranno amplificate e i vari cloni verranno analizzati quantitativamente per la produzione di HCV-RNA sia nel citoplasma che nel terreno di coltura. Tale analisi verrà effettuata tramite PCR real-time sull'RNA estratto dal medium di coltura e sull'RNA totale delle HuH7.5. Saranno selezionati i cloni con le più elevate concentrazioni di virus ed il medium condizionato di queste cellule sarà titolato con PCR real-time previa concentrazione per filtrazione attraverso membrane con cut-off di 100.000 Dalton (Centricon, Millipore).

FASE 2

7) Analisi immunofenotipica delle cellule B-FR

Il fenotipo dei cloni B-FR verrà analizzato tramite citofluorimetria di flusso; verrà inizialmente definito a quale sub-popolazione le cellule B-FR appartengano tramite incubazione con vari anticorpi caratterizzanti le cellule B memoria, B1, B2 o CD5⁺ come proposto da alcuni autori. Successivamente si cercherà di identificare un pattern di espressione di antigeni di superficie caratteristico di questa particolare popolazione.

8) Analisi genetica delle cellule B-FR

Sarà inizialmente determinata la specificità del recettore dei linfociti B (BCR) attraverso il sequenziamento delle regioni variabili dei geni delle immunoglobuline (Ig-Vh); la specificità anticorpale dei cloni B-FR, basata sulla sequenza aminoacidica delle regioni Vh-CDR3 del BCR, sarà predetta attraverso il confronto di con le regioni Vh-CDR3 di anticorpi a specificità conosciuta.

Verrà inoltre valutata la presenza della traslocazione t(14;18) in tali cloni; il nostro gruppo di ricerca ha precedentemente dimostrato un'elevata frequenza di questo riarrangiamento cromosomico nei soggetti con infezione HCV e specialmente in pazienti con CM-HCV correlata (Zignego et al 2000 e 2002). La t(14;18) coinvolge il gene antiapoptotico bcl-2 e ne provoca l'overespressione; la coesistenza delle due caratteristiche, produzione di RF e positività per la t(14;18), spiegherebbe la prolungata sopravvivenza di tali cloni cellulari e, in conseguenza, la sostenuta produzione di IgM ad attività di fattore reumatoide che caratterizza la CM.

9) Analisi degli effetti di proteine virali sull'attivazione delle cellule B-FR

Si procederà quindi all'identificazione di antigeni virali potenzialmente coinvolti nell'espansione clonale dei linfociti B-FR; le cellule verranno coltivate in presenza di proteine ricombinanti dell'HCV (anche nella forma complessata con lipoproteine): E1, E2, il dimero E1-E2, la proteina del core. L'attivazione a seguito dello stimolo antigenico verrà quantificata tramite la valutazione della produzione di anticorpi (test ELISA) e la proliferazione cellulare determinata con test colorimetrici (Alamar Blue), incorporazione di timidina triaziata, valutazione in western blot dell'espressione di marker di replicazione (PCNA, pERK, ecc).

10) Caratterizzazione dell'interazione tra le cellule B-FR e le particelle HCV purificate dal sopranatante

Al fine di caratterizzare l'effetto della particella virale completa sull'attivazione delle cellule produttrici di crioglobuline, i cloni B-FR verranno coltivati in presenza di concentrazioni variabili di virioni HCV provenienti dalle colture di HuH7.5 con JFH-1. Anche in questo caso, la possibile attivazione delle cellule B-FR dovuta all'interazione con la particella virale sarà determinata, con test ELISA, per quanto riguarda la produzione di IgM-FR nel terreno di coltura e con test colorimetrici e biochimici per valutare eventuali variazioni del tasso di proliferazione (vedi sopra). Sarà inoltre interessante valutare se il contatto con la particella virale possa attivare i meccanismi intracellulari di sopravvivenza (over-espressione di geni antiapoptotici come bcl2, bcl-xL ecc), fenomeno che sembrerebbe accordarsi con dati ottenuti precedentemente dal nostro gruppo di ricerca e che vedevano la necessità della presenza del virus per la persistenza di cellule produttrici di CG in soggetti con CM.

RISULTATI ATTESI

Dallo studio qui presentato ci attendiamo, per la prima volta, di caratterizzare sia dal punto di vista genetico che da quello fenotipico/funzionale i linfociti B produttori di IgM ad azione di FR responsabili della patogenesi della CM, una malattia cronica invalidante e con possibilità di evoluzione verso la franca neoplasia, rappresentata prevalentemente dal linfoma non-Hodgkin. La disponibilità di tecnologie all'avanguardia, come il sistema di coltura e produzione di particelle virali in-vitro, permetterà di esplorare settori di ricerca fino ad oggi inaccessibili e quindi di poter definire bersagli sia cellulari che virali potenzialmente utilizzabili per la definizione di nuovi approcci terapeutici volti a risolvere la CM-HCV correlata.

Riassunto del progetto

L'infezione da virus dell'epatite C (HCV) rappresenta un primario problema di salute pubblica a livello globale. Si stima infatti che circa il 3% della popolazione mondiale sia infettata (oltre 170 milioni), almeno 2 milioni di soggetti solamente nel nostro Paese. L'HCV infetta preferenzialmente il fegato, ma replica attivamente anche in cellule di tipo linfatico, specialmente in linfociti B. Questo tropismo sia epatico che linfatico si riflette sulle manifestazioni cliniche dell'infezione che sono rappresentate, da un lato, dall'epatite cronica, la cirrosi e l'epatocarcinoma (HCV è la prima causa di cancro del fegato nei paesi industrializzati), mentre dall'altro, da un'ampia serie di disordini autoimmuni linfoproliferativi che possono evolvere in circa il 10% dei casi in una franca malignità ematologica (linfoma). La Crioglobulinemia Mista (CM) rappresenta di fatto la manifestazione extraepatica da HCV per la quale è disponibile il maggior numero di dati e per la quale il legame patogenetico con l'infezione è oggi praticamente indiscusso dato che la presenza di marker HCV è riscontrabile in oltre il 90% dei soggetti. Questo disordine linfoproliferativo pre-linfomatoso ha notevoli ripercussioni sulla qualità di vita dei pazienti a causa delle gravi vasculiti, artralgie, neuropatie e frequenti ulcere cutanee. Gli studi fino ad ora condotti per identificare le basi patogenetiche della CM-HCV correlata hanno potuto solamente delineare alcuni aspetti di tale disordine. L'acquisizione di nuove tecnologie da parte del nostro gruppo, quali per esempio la possibilità di replicare l'HCV in cellule in coltura, potrebbe rappresentare la chiave di volta per identificare e caratterizzare le popolazioni linfocitarie responsabili della produzione delle crioglobuline, complessi di IgM e IgG che precipitano nei vasi a bassa temperatura e che sono alla base delle manifestazioni cliniche.

Il presente programma di ricerca si prefigge l'obiettivo principale di caratterizzare queste popolazioni cellulari da un punto di vista genetico e funzionale e di identificare le proteine virali o le regioni del virione HCV che sono responsabili della loro abnorme attivazione e produzione di immunoglobuline. Questo sarà possibile grazie all'unione di più fattori quali la disponibilità di laboratori con livello di sicurezza contro il rischio biologico di tipo 3, presenti presso il Dipartimento di Sanità Pubblica dell'Università degli Studi di Firenze, l'ampia casistica di pazienti con CM-HCV correlata presente nel database del Centro Masve e le tecnologie innovative come i repliconi JFH-1, gentilmente forniti dal Dr. Wakita del National Institute for Infectious Diseases di Tokio, che ci permetteranno di utilizzare particelle virali neo sintetizzate nel medium di coltura senza doverle purificare dal siero di soggetti infettati, approccio già dimostratosi inefficace in studi precedenti pubblicati da altri gruppi di ricerca.

Schematicamente, il progetto articolato su due anni prevede i seguenti punti:

FASE 1

- 1) Reclutamento e selezione dei soggetti con CM HCV-correlata
- 2) Separazione PBMC e isolamento dei linfociti B
- 3) Generazione di linee cellulari B linfocitarie policlonali
- 4) Selezione dei cloni produttori di IgM-FR
- 5) Coltura e trasfezione della linea epatocitaria HuH7.5 con il replicone HCV JFH-1
- 6) Valutazione della produzione intracellulare e nel medium di coltura di virioni HCV

FASE 2

- 7) Analisi immunofenotipica delle cellule B-FR
- 8) Analisi genetica delle cellule B-FR
- 9) Analisi degli effetti di proteine virali sull'attivazione delle cellule B-FR
- 10) Caratterizzazione dell'interazione tra le cellule B-FR e le particelle HCV purificate dal sopranatante