

# Påvisning af humant papillomvirus

## Anvendt molekylær patologi

**Henning Lindeberg**

Molekylærbiologiske metoder har fået stor betydning for histopatologisk diagnostik. Anvendelsen af monoklonale antistoffer i patologien har gennem det sidste tiår gennemløbet en stor udvikling, og immunhistologiske teknikker anvendes i dag af alle patologiske afdelinger. I samme tidsrum har udviklingen i molekylær biologi stillet en række dna- og rna-teknikker til rådighed. Implementering af disse metoder i patologien har givet anledning til et nyt område, *molekylær patologi*. Hensigten med dette arbejde er at orientere om nogle af de metoder som baserer sig på anvendt dna-teknologi og som får stadig større betydning i diagnostikken.

Principperne i de beskrevne metoder er overordentlig simple. Når det alligevel kan synes vanskeligt at forstå metoderne, skyldes det efter forfatterens opfattelse nok mest at mange står fremmede over for nomenklaturen.

**D**na (*deoxynucleic acid*) er en polymer af enkeltnukleotider. De enkelte nukleotider er bundet til hinanden via fosfatgrupper der går fra kulstofposition 5' i det ene nukleotid til kulstof 3' på det næste nukleotid. Hvert nukleotid er forsynet med én ud af fire mulige baser: adenosin, thymidin, cytidin og guanodin. Til daglig brug anvendes betegnelserne A,T,C og G. Tilsvarende kaldes det enkelte deoxynukleotid med tilhørende base for dATP, dTTP, dCTP og dGTP, idet TP står for trifosfat og d står for deoxy. dATP læses således som deoxy-adenosin-trifosfat. For en blanding af alle fire nukleotider anvendes betegnelsen dNTP.

De strengformede nukleotidpolymerer er bundet parvist til hinanden således at man ved dna i almindelighed forstår dobbeltstrengt dna. Bindingen mellem de to strenge går mellem modstående baser idet der til et A på den ene streng altid er bundet et T på den modsatte streng, og ligeledes er et C på den ene streng altid bundet til et G på den modsatte streng. De to strenge er modsat rettede, og hvor den ene streng har en 3'-ende, har den anden streng en 5'-ende. Dvs. at har man fastlagt den ene strengs basesekvens, kender man indirekte også den homologe strengs sekvens. Disse forhold fremgår af Fig. 1. Rækkefølgen af baserne, aflæst tre ad gangen i retning 5'→3', angiver i øvrigt den genetiske kode. Således koder fx ATG (adenosin-thymidin-cytidin) for aminosyren methionin. Bestemmelse af rækkefølgen af de enkelte baser i en dna-streng kaldes sekventering.

### Orientering om humant papillomvirus

Humant papillomvirus (HPV) er et lille dna-virus der består af dobbeltstrengt cirkulært dna, indeholdt i en proteinskal. Der er omkring 8.000 basepar (bp). De otte til ni læserammer (*open reading frames*, »gener») er alle placeret på den samme streng mens den homologe streng ikke indeholder gener. Hvert gen koder for et protein; fx koder generne L1 og L2 for de to proteiner som danner virus' proteinskal.

Der kendes 77 forskellige typer af HPV, og de er blevet

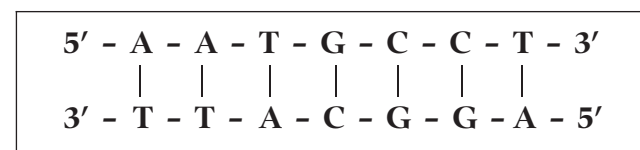


Fig. 1. Skematisk fremstilling af et kort stykke dobbeltstrengt dna. De to strenge er bundet til hinanden ved forbindelser mellem baserne A og T samt C og G. Længden angives som antal basepar, her 7 bp.

Fig. 1. Schematic illustration of a short double-stranded DNA fragment. The two strands are connected by bridging between the bases A and T, and C and G respectively. The number of basepairs are used as an indication of the length, here 7 bp.

nummereret fra 1-77 efterhånden som de er opdaget. Med enkelte undtagelser er dna-sekvenserne bestemt for samtlige nummererede typer. Desuden er der omkring 40 nye typer under udredning. Disse er kun delvist sekventerede og vil med tiden indgå i rækken af nummererede HPV-typer. De forskellige typer defineres alene ud fra forskelle i deres dna-sekvenser. Oplysninger om samtlige kendte HPV-typer kan indhentes over Internettet på adressen <http://hpv-web.lanl.gov/> (1). Interessen for HPV skyldes først og fremmest relationen mellem visse HPV-typer (HPV type 16, 18, 31, 33, 35, 45 og flere andre) og udviklingen af livmoderhalskræft. HPV er imidlertid ikke uden odontologisk interesse: fokal epitelial hyperplasi (FEH) synes altid at indeholde HPV type 13 eller type 32, og desuden er der fundet HPV-dna i oral cancer, i leukoplakier, i orale papillomer samt ved lichen planus. Det skal dog understreges at der er mange modstridende rapporter om forekomsten af HPV i hoved-hals-cancer.

Typebestemmelse af HPV kan foretages på flere måder som dog alle involverer molekylærbiologiske metoder, hyppigst dna-hybridisering.

### Dna-hybridisering

Ved opvarmning af dobbeltstrengt dna, fx ved kogning i en vandig opløsning, vil bindingerne mellem strengene bryde, så man får en varm opløsning af enkeltstrengt dna. Den temperatur ved hvilken bindingerne brydes, betegnes smeltepunktet ( $T_m$ ). Ved afkøling sker det omvendte: bindingerne reetableres, så vi atter får gendannet dobbeltstrengt dna. Omdannelsen fra dobbeltstrengt til enkeltstrengt dna kaldes denaturering mens den modsatte proces betegnes *annealing* (Fig. 2.)

Denne simple egenskab ved dobbeltstrengt dna giver mulighed for at undersøge om en foreliggende prøve indeholder fx dna fra HPV type 13: til den denaturerede (fx kogte) prøve tilsættes denatureret og i forvejen mærket HPV 13 dna. Under den efterfølgende afkøling vil det mærkede dna (probe-dna) binde sig til umærket HPV 13 dna (target-dna) og danne dobbeltstrengede dna-hybrider, såfremt HPV 13 er til stede i prøven (Fig. 3). Hybrider mellem umærket og mærket dna vil derefter kunne visualiseres pga. den forudgående mærkning. Probe-dna kan mærkes på forskellig måde; tidligere var radioaktiv mærkning meget brugt, men efterhånden er der tilkommet forskellige ikke-radioaktive markørmolekyler. I dette arbejde bruges digoxigenin, et digoxin-lignende protein.

Dna-hybridisering er en helt basal teknik med et stort antal anvendelsesmuligheder, bl.a. *Southern blotting* og PCR. Ved dna in situ-hybridisering foregår hybridiseringen direkte på

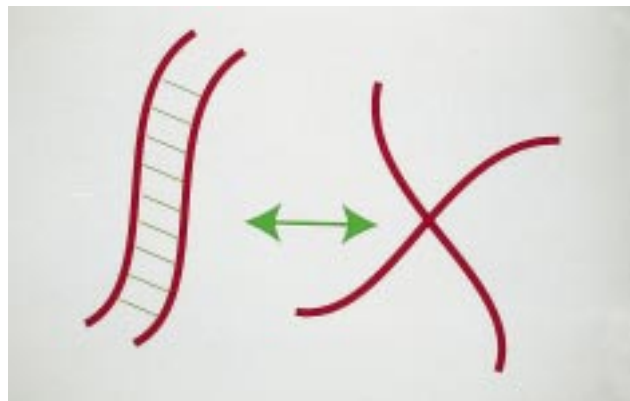


Fig. 2. Ved opvarmning af dobbeltstrengt dna brydes bindingerne mellem de to strenge, så dna'et omdannes til enkeltstrengt dna. Ved afkøling gendannes de oprindelige bindinger mellem baserne, så udgangssituationen reetableres.

Fig. 2. When doubled-stranded DNA is heated the bridges between the two strands disrupt and the DNA is converted into single-stranded DNA. When cooled the bridges are regenerated and the original situation re-established.

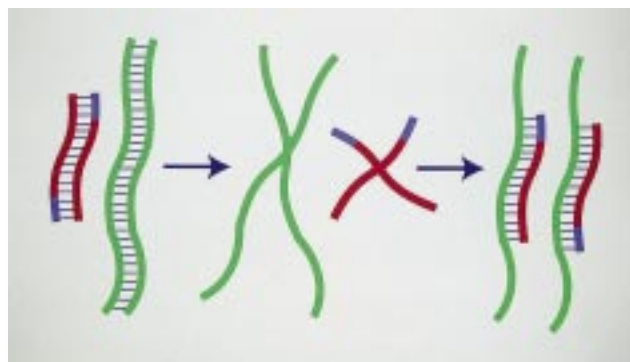


Fig. 3. Dna-hybridisering: Ved at koge en ukendt dna-prøve (target dna) sammen med kendt, mærket dna (probe dna) vil der ved afkøling dannes hybrider mellem probe-dna og target-dna, forudsat at target og probe indeholder de samme dna-sekvenser. Rød: Mærket probe dna. Blå: Target dna.

Fig. 3. DNA hybridization: By boiling an unknown DNA-sample (target DNA) together with known and labelled DNA (probe DNA), hybrids will subsequently form between the target DNA and the probe DNA, provided the target and the probe DNA contain identical DNA sequences. Red: Labelled DNA probe. Blue: Target DNA.

histologiske snit, og resultatet ses i mikroskop. Ved filterhybridisering bindes enkeltstrengt dna til specielle nylon-filtre. Man kan herefter foretage dna-hybridisering ved til sætning af dna-prober. Resultatet viser sig som farvede pletter, *dots* (heraf betegnelsen *dot blot*), på filterpapiret. ▶

## PCR

Ved PCR (*polymerase chain reaction*) mangfoldiggøres (amplificeres) et mindre dna-stykke. Teknikken består i hybridisering af to korte, enkeltstrengede dna-stykker (primere), efterfulgt af en enzymatisk dna-syntese. Herved dannes en kopi af den del af den oprindelige dna-streng som afgrænses af primerne, hvorefter processen gentages. Oftest anvendes 30-40 cykler. Ved hver cyklus sker der en fordobling af target-sekvenserne således at man efter 40 cykler har op mod  $2^{40}$  gange mere dna end der var til stede i udgangsmaterialet. Der sker altså en eksponentiel forøgelse af target-sekvensen (2). Den praktiske betydning er at hvis HPV findes i en prøve i så små mængder at det ikke kan påvises, får man ved PCR fremstillet et så stort antal dna-kopier at mængden af HPV-dna kommer over detektionsgrænsen.

De primere der anvendes, er ofte ganske korte (20-30 baser). Sådanne korte stykker enkeltstrengede dna fremstilles på maskine.

Det amplificerede dna køres på en agarosegel (gelelektroforese) hvor dna-fragmenterne vandrer i et elektrisk felt. Da korte dna-stykker vandrer hurtigere end lange stykker, får man dna-fragmenterne sorteret efter størrelse. Ved tilsætning af ethidiumbromid (et fluoriserende stof der bindes til dna) kan dna-fragmenterne efterfølgende visualiseres ved UV-transillumination.

## Filter-hybridisering af PCR-produkter

Det amplificerede dna kan overføres til specielle nylonfiltre som binder denatureret dna. Herefter kan man hybridisere med mærkede prober til dna på filtret og efterfølgende visualisere eventuelle hybrider. Visualiseringsteknikken afhænger af hvordan proberne er mærkede. Ved digoxigenin-mærkede prober vil man tilsætte antidigoxigenin-alkalisk fosfatase kompleks og derefter et farvedannende substrat for alkalisk fosfatase; resultatet aflæses så ved iagttagelse af farvereaktionen.

Ved *Southern blotting* overføres dna fra agarosegelen til nylonfilter. Det kan ske ved kapillær-*blotting* eller ved at anbringe gel + filter i kontakt i et elektrisk felt. Herefter kan filterhybridisering foretages som beskrevet. Metoden indebærer den fordel at det positive signal kan korreleres til dna-fragmenternes størrelse.

## RFLP

Ved restriktions-fragment-længde-polymorfi-analyse (RFLP) skæres det amplificerede dna med restriktionsenzym, dvs. dna-skærende enzymer, som skærer dna-strengen over når bestemte basesekvenser forekommer. Dette fører til dannelsen af flere, men kortere dna-bånd end det oprindelige. Læng-

den af de skårne dna-bånd analyseres igen ved gelelektroforese, og ud fra båndenes størrelsesfordeling kan man med kendskab til de forskellige HPV-typers basesekvenser afgøre hvilken eller hvilke HPV type(r) der er til stede.

## Eksempler på påvisning af HPV i fokal epitelial hyperplasi

### Eksempel 1 – Dna in situ-hybridisering

Fra afdelingens arkiv vælges en biopsi fra en fokal epitelial hyperplasi-læsion (FEH), taget i 1981 fra en fireårig pige. Der foretages dna in situ-hybridisering med digoxigenin-mærkede prober mod HPV type 6, 11, 13 og 32 idet snittene hybridiserer natten over ved 42°C. Næste dag vaskes snittene og inkuberes med antidigoxigenin, konjugeret til alkalisk fosfatase. Ved efterfølgende reaktion med NBT+ BCIP (Nitro Blue Tetrazolium og 5-Bromo-4-Klor-3-Indolyl-Fosfat i dimethylformamid) der sammen udgør et substrat for alkalisk fosfatase, dannes et blå-sort præcipitat svarende til kerner i epitelets øverste lag som tegn på at tumor indeholder HPV 32 (Fig. 4). Der er ingen reaktion for typerne 6, 11 eller 13.

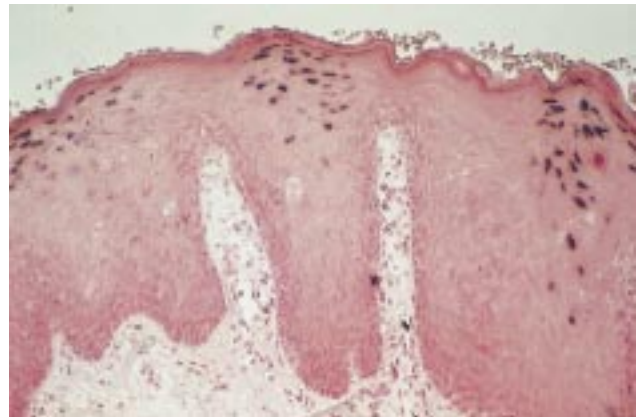


Fig. 4. Påvisning af HPV type 32 ved dna in situ-hybridisering. De mørke kerner i epitelets superficielle lag indikerer tilstedeværelsen af HPV 32 dna.

Fig. 4. Demonstration of HPV type 32 by DNA in situ-hybridization. The dark-stained nuclei in the upper layers of the epithelium indicate the presence of HPV 32 DNA.



Fig. 5. Eksempel 2. Der ses tre FEH-læsioner. Mikroskopi af den mest distale læsion ses i Fig. 6.

Fig. 5. Example 2. Three FEH-lesions are seen. Histology of the distal lesion is seen in Fig. 6.

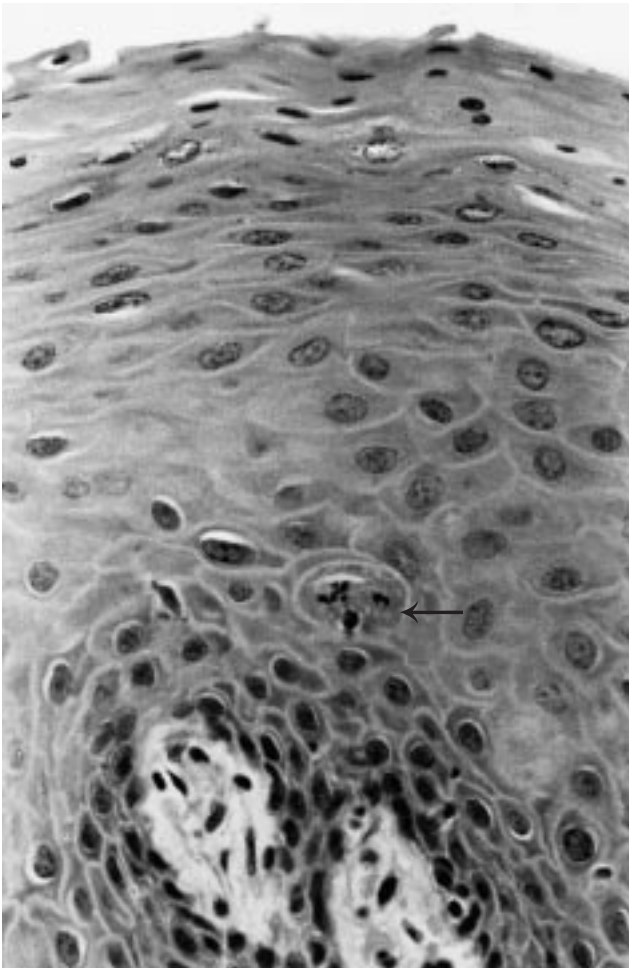


Fig. 6. Biopsi fra FEH-lesion. Bemærk den mitosoide figur (pil).

Fig. 6. Biopsy from FEH-lesion. Note the mitosis-like figure.

#### Eksempel 2 – PCR kombineret med Southern blotting og filterhybridisering

En 60-årig kvinde har i flere år haft multiple, bløde papillomatøse tumorer i kindslimhinden på begge sider og på underlæben (Fig. 5). Mikroskopi var forenelig med FEH (Fig. 6).

Af vævsblokken skæres nye snit til PCR. Snittene anbringes i centrifugerør og behandles med Proteinase K (200 µg/ml i H<sub>2</sub>O i tre timer ved 65°C). Efter centrifugering, hvorved paraffin lægger sig øverst, overføres den vandige komponent til et nyt rør og opvarmes til 95°C i 10 min. for at inaktivere proteinasen. Tre µl heraf anvendes ved PCR. Desuden tages skrab med træpind fra overfladen af en af de resterende tumorer. Skrabet overføres til et centrifugerør med fysiologisk saltvand. Heraf udtages ligeledes 3 µl til PCR. PCR foretages i 30 µl volumen med HPV-consensusprimere MY09 og MY11. Disse primere vil amplificere et 450 bp fragment fra et stort

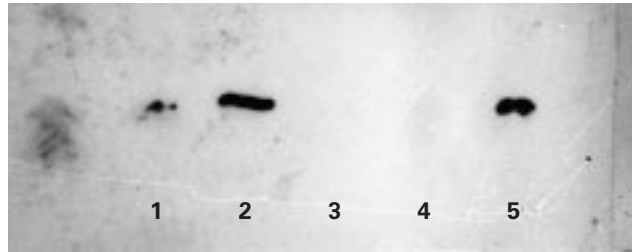


Fig. 7. Filterhybridisering af amplificeret HPV dna fra eksempel 2. Det amplificerede dna er overført fra gel til nylonfilter (Southern blotting), hvorefter der er hybridiseret med digoxigenin-mærket HPV 13 dna. HPV dna fra celleskrab (lane 1) samt fra biopsi (lane 2) er positive for HPV 13. Lane 4 er en negativ og lane 5 en positiv kontrol.

Fig. 7. Filterhybridization of amplified HPV DNA from example 2. The amplified DNA has been transferred from the gel to nylon filter (Southern blotting) and hybridized with digoxigenin-labelled HPV 13 DNA. HPV DNA from an oral smear (lane 1) and from the biopsy (lane 2) are positive for HPV 13. Lanes 4 and 5 are a negative and a positive control, respectively.

antal af de kendte HPV-typer. Sideløbende blev dna fra skrabeprov samt genomisk HPV 13 dna amplificeret. Der blev anvendt 40 cykler, hver bestående af denaturering ved 94°C i ét min., *annealing* ved 55°C i ét min. og *primer extension* ved 72°C i ét min. Det amplificerede materiale kørtes på en 4% agarosegel (NueSieve 3:1) som efterfølgende blev farvet med ethidiumbromid og inspiceret i UV-belysning. Som forventet fandtes et ca. 450 bp langt dna-bånd fra biopsi, skrab og klonet HPV 13 (positiv kontrol) mens en negativ kontrol forblev negativ. På dette tidspunkt er der således påvist HPV i biopsi og skrab; næste trin består at bestemme hvilke(n) HPV-typer, der er tale om.

Dna i gelen denatureres i 0,4 M NaOH og overføres ved Southern blotting til nylonfilter (Nytran). Der foretages filterhybridisering med digoxigeninmærket genomisk HPV 13 som probe. Herved påvises HPV type 13 i både skrab og biopsi (samt i den positive kontrol (Fig. 7)).

I dette eksempel blev der anvendt consensus-primere MY 09 og MY11, dvs. en blanding af næsten ens primere der er valgt således, at de sammen vil kunne amplificere dna fra mange forskellige HPV-typer. Et positivt amplificeringssignal siger i så fald kun at der er HPV til stede, mens typen må fastlægges på anden måde, her ved dna-filterhybridisering efter Southern blotting.

#### Eksempel 3 – Påvisning af HPV 13 ved PCR og RFLP

En niårig tyrkisk pige henvises for multiple, konfluerende, bløde tumorer på kind- og læbeslimhinde. Klinisk diagnose er FEH, og histologisk undersøgelse understøtter diagnosen, ►

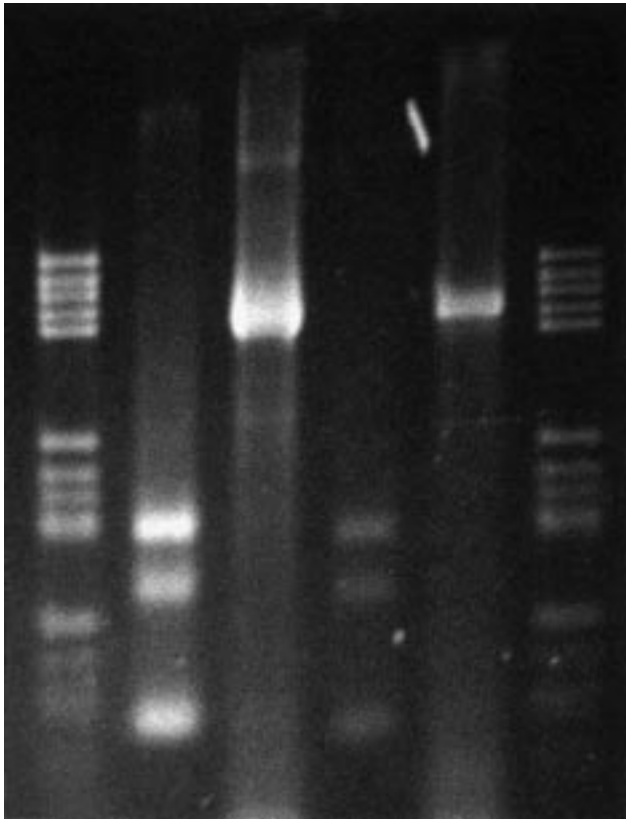


Fig. 8. Restriktions-fragment-længde-polymorfi-analyse (RFLP) af amplifieret dna fra FEH-læsion (eksempel 3). Det amplifierede 450 bp HPV fragment er skåret med restriktionsenzym Rsa I og analyseret ved gelelektroforese. Lane 1 & 6: Dna størrelsesmarkør. De korteste fragmenter er nederst. Lane 2: Resultatet af skæring med Rsa I. De tre bånd repræsenterer ca. 175 bp, 107+100 bp (ses som ét bånd) samt 73 basepar. Lane 3: Uskåret HPV DNA, ca. 450 bp. Lane 4: Positiv kontrol – amplifieret genomisk HPV 13 dna viser samme restriktionsmønster som materialet fra patienten. Lane 5: Amplificeret genomisk HPV 13 DNA, ca. 450 bp.

Fig. 8. Restriction-fragment-length-polymorphism analysis (RFLP) of amplified DNA from FEH-lesion (example 3). The amplified 450 bp HPV fragment has been cut with restriction enzyme Rsa I and analyzed by gelelectrophoresis. Lanes 1 & 6: DNA size markers. The shortest fragments are at the bottom. Lane 2: The result of cutting with Rsa I. The three bands represent approximately 175 bp, 107+100 bp (viewed as a single band), and 73 bp. Lane 4: Positiv control – amplified genomic HPV 13 DNA exhibits bands of the same size as the sample from the patient. Lane 5: Amplified genomic HPV 13 DNA, approximately 450 bp.

uden dog at være helt sikker. Med træpind tages skrab fra læsioner i venstre mundvig, og skrabet overførtes til et 1,5 ml centrifugerør med 250 µl H<sub>2</sub>O.

Ved in situ-hybridisering af den oprindelige biopsi påvistes HPV type 13. Skrabeproven anvendtes til PCR med MY consensusprimerere, og ved den efterfølgende gelelektroforese

fandtes som forventet et 450 bp HPV dna-bånd. Dna-båndet blev skåret ud af gelen, oprenset og skåret med restriktionsenzym Rsa I der skærer dna med basesekvensen GT/AC. Sideløbende blev genomisk HPV 13 isoleret fra klonede bakterier, amplifieret og skåret med Rsa I som en positiv kontrol. Begge dele kørtes atter på en agarosegel og viste samme restriktionsfragmentmønster idet der fremkom tre bånd på ca. 175, 100 og 71 bp. Ud fra den kendte dna-frekvens af HPV 13 skulle man forvente fire bånd: 175, 107, 100 og 73 bp, men ved elektroforese på agarosegel kan man ikke skelne mellem bånd på 107 og 100 bp; de fremtræder som ét bånd (Fig. 8).

Kombinationen af de kliniske fund, den ikke helt diagnostiske histologi samt påvisning af HPV 13 førte til at diagnosen FEH kunne bekræftes.

### Kommentarer

I de tre tilfælde kunne man have nøjedes med dna in situ-hybridisering. Metoden er imidlertid mere tidskrævende end PCR, og HPV 13 og HPV 32 prober er ikke kommercielt tilgængelige. Desuden er in situ-hybridisering ikke særlig sensitiv, og der kan være tvivl om specificiteten; fx kan man ved in situ-hybridisering ikke skelne mellem HPV type 6 og type 11. Ved at supplere med PCR med efterfølgende filter-hybridisering (eksempel 2) eller efterfølgende restriktions-fragment-længde-polymorfi-analyse (RFLP) som i eksempel 3, opnås større sikkerhed i svaret, og ved RFLP får man desuden mulighed for at afgøre om der er flere HPV-typer til stede. FEH indeholder altid HPV type 13 eller 32 (3), men type 6 eller 11 kan findes som co-infektion.

Hensigten med det foreliggende arbejde har først og fremmest været at demonstrere at oral patologi ikke kun omfatter mikroskopering af hematoxylin-eosin-farvede snit; der står et meget stort antal metoder til rådighed. Det kan forekomme paradoksalt at i takt med udviklingen af nye metoder i patologien er der en skandinavisk tendens til at reducere eller nedlægge oralpatologiske afdelinger.

De omtalte metoder kan benyttes til påvisning af arvematiale fra mange andre virus og bakterier: EBV (bl.a. i »håret« leukoplaki og i malignt lymfom), HSV (fx HSV type 8 i Kaposis sarkom), chlamydia, pneumocystis carinii (ved hiv), mykobakterier, HBV, listeria og mange andre. Detaljer om teknikkerne og om almene forhold vedr. dna findes beskrevet mange steder (2-12). ■

### English summary

Detection of human papillomavirus – examples of the application of different methods used in molecular pathology

The aim of the present article is to demonstrate the applica-

tion of DNA technology in oral pathology. Some basic features of DNA are presented (Figs. 1 and 2), and the principles of DNA hybridization, including in-situ hybridization, filter-hybridization and Southern Blotting, are explained. PCR is briefly described as a method to amplify DNA by repeating cycles of hybridization and enzymatic DNA-synthesis. Finally, RFLP is mentioned as a method to analyse DNA fragments of different sizes following digestion with restriction enzymes.

Human papillomavirus (HPV) is a small virus (some 8000 bp) that consists of double-stranded circular DNA. At present more than 100 HPV types are known. Some of these types are considered oncogenic in the uterine cervix, but in addition HPV also plays a role in oral pathology. Finally, detection and typing of HPV is demonstrated in three examples of focal epithelial hyperplasia (FEH, Heck's disease).

Example 1: HPV type 32 is demonstrated in a sample from 1981 (Fig. 4).

Example 2: A biopsy as well as an oral smear from a FEH-lesion is examined (Figs. 5 and 6). By PCR with HPV consensus-primers, gel-electrophoreses revealed a 450 bp HPV DNA fragment. After Southern blotting and filterhybridization HPV type 13 is detected in the samples (Fig. 7).

Example 3: Typing of HPV by RFLP-analysis: A sample from a nine-year-old girl is examined by PCR with HPV consensus-primers. The resulting 450 bp HPV band is cut with the DNA restriction enzyme Rsa I and subjected to gel-electrophoreses. The presence of identical DNA fragments in the sample from the patient as well as in the cloned HPV 13 is interpreted as HPV 13 being present in the patient's oral lesions.

Den Obelske Familiefond, Aalborg, har ydet økonomisk støtte.

## Litteratur

1. Burk RD. The on-line HPV sequence database: a tour of an evolving masterpiece. *Papillomavirus Report* 1986; 7: 25-8.
2. Syrjänen S. Basic concepts and practical applications of recombi-

nant DNA techniques in detection of human papillomavirus (HPV) infections. *APMIS* 1990; 90: 95-110.

3. Henke R-P, Guérin-Reverchon I, Milde-Langosch K, Strömme-Koppang H, Lönning T. In situ detection of human papillomavirus types 13 and 32 in focal epithelial hyperplasia of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med* 1989; 18: 412-21.
4. Herrington CS, McGee J O'D, editors. *Diagnostic molecular Pathology. Vol. I & II.* Oxford: IRL Press, 1992.
5. Eike A, Buchwald C, Rolighed J, Lindeberg H. Human papillomavirus (HPV) is rarely present in normal oral and nasal mucosa. *Clin Otolaryngol* 1995; 20: 171-3.
6. Buchwald C, Franzmann M-B, Jacobsen GK, Lindeberg H. Human papillomavirus (HPV) in sinonasal papillomas: A study of 78 cases using in-situ hybridization and polymerase chain reaction. *Laryngoscope* 1995; 105: 66-71.
7. Buchwald C, Franzmann M-B, Jacobsen GK, Lindeberg H. The presence of human papillomavirus in sinonasal papillomas, demonstrated by polymerase chain reaction with consensusprimers. *Hum Pathol* 1993; 24: 1354-6.
8. Rolighed J, Lindeberg H. Detection of HPV 11 DNA in paraffin-embedded laryngeal tissue with a DIG-labelled DNA probe. I: Boehringer's Nonradioactive in situ hybridization application manual. 2nd ed. Mannheim, 1996: 122-5.
9. Møller B, Lindeberg H. The presence of HPV types 6/11 and 16 in a giant vulvar carcinoma, arising in pre-existing condylomas, demonstrated by PCR and DNA in-situ hybridization. *Eur J Gynecol Oncol* 1996; 17: 497-500.
10. Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore D, Seidman J, Smith J, et al., editors. *Short protocols in molecular biology. A compendium of methods from Curr Protocols Mol Biol.* 3rd ed. USA: John Wiley, 1995.
11. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular cloning, a laboratory manual.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
12. Watson J, Hopkins N, Steitz J, Weiner A. *Molecular biology of the gene.* 4th ed. Menlo Park; Calif: The Benjamin/Cummings Publ. Comp., 1987.

## Forfatter

Henning Lindeberg, ph.d., dr.med., lektor i oral patologi  
Afdeling for Tand-, Mund- og Kæbekirurgi samt Oral Patologi,  
Odontologisk Institut, Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet,  
Aarhus Universitet