

Akrosentrik Kromozomlardaki Satellit Asosiasyonunun
Tesadüfi Olup Olmadığının Araştırılması

Dr. Aynur Acar*, Dr. Sennur Demirel*,

Arş. Gör. Hasan Acar**

ÖZET

10 sağlıklı yenidoğan bebeğin kordon kanından elde edilerek çeşitli konsantrasyonlardaki Bromodeoxyuridine (BrdU) mevcudiyetinde üretilen hücrelerde akrosentrik kromozom asosiasyonları incelendi ve değerler BrdU ilave edilmeyen hücrelerdeki değerlerle karşılaştırıldı. Sonuçta, BrdU ilave edilen ve edilmeyen hücrelerdeki Satellit Asosiasyon oranları arasında önemli farklılıklar mevcut olmadığı görüldü. BrdU mevcudiyetinde üretilen hücrelerde gözlenen asosiasyonlar kromozom grupları ve asosiasyon tiplerine göre sınıflandırıldığında ne BrdU konsantrasyonunun ne de asosiasyon tipinin satellit asosiasyonlarının frekansına etki etmediği görüldü. BrdU mevcudiyetinde üretilen hücrelerde, asosiasyon halindeki akrosentrik kromozomlarda kromatidlerin tesadüfi olmayan bir şekilde davrandığına dair herhangi bir delil elde edilemedi.

SUMMARY

A Study on the Satellite Association in Acrocentric
Chromosomes: Is it a Randomized Phenomena ?

Blood samples were obtained from 10 healthy newborn babies and cultured in the mediums containing various

* : S.Ü.Tıp Fakültesi Tıbbi Bio. ve Gen. ABD. Yrd. Doç. Dr.

** : S.Ü.Tıp Fakültesi Tıbbi Bio. ve Gen ABD. Araştırma Görevlisi.

concentrations of Bromodeoxyuridine (BrdU). The produced cells then investigated for acrocentric chromosome associations and compared with those of control cells produced in the absence of BrdU. The satellit association rates of the cells produced with or without BrdU found to be unchanged. Also, the association of the chromosomes in the produced cells in the mediums containing BrdU was classified according to chromosome groups and the types of association, and it was found that neither BrdU concentrations nor the type of association scored had any significant effect on the frequency of chromatid association. Thus, we found no evidence for a nonrandom alignment of chromatids in associated acrocentric chromosomes.

GİRİŞ

İnsanda 13,14,15 ve 21,22 numaralı 5 çift akrosentrik kromozomun kısa kollarına rRNA ları kodlayan genler taşıyan bölgeler yerleşmiştir. Bu bölgeler "Nükleolusu Oluşturan Bölgeler" (Nucleolar Organizer Regions-NORs-) olarak adlandırılır (1,2,3). Birden fazla kromozomun NOR DNA'ları çözünerek tek bir nükleolusun oluşmasını sağlar. Mitoz esnasında, nükleolus gözden kaybolur fakat nükleolus oluşumuna katılan akrosentrik kromozomların kısa kolları metafaz evresinde yakınlıklarını koruyarak gruplar oluşturabilirler. Bu görünüm "Satellit Asosiasyonu" olarak isimlendirilir ve bu yakınlık daha sonraki metafazda da devam eder. Asosiasyon halindeki kromozomların nükleoprotein komplekslerinin birbirleri ile çok yakın bir ilişki içinde olduğu otoradyografik olarak gösterilmiştir (4,5).

Hücre bölünmesinin anafaz evresinde, herhangi bir kromozomun kromatidlerinin diğer kromozomlardan bağımsız olarak ayrılıp, kutuplara doğru çekildiği Genetik'de kabul edilen

temel bir görüştür. Bu nedenle, metafaz kromozomlarında gözlenen Satellit Asosiasyonu (SA) na etki eden faktörleri araştırmak amacıyla pekçok çalışma yapılmıştır (6,7,8,9,10). Bu çalışmalardan bazılarında; sekonder darlıkların büyüklüğü, NOR aktiviteleri ve rDNA miktarları ile kullanılan doku tipinin SA frekansına etki edebileceği bildirilmiştir (11,12,13). Ayrıca, son zamanlarda geliştirilen ve bir kromozomun iki kromatidinin farklı boyanmasını sağlayan boyama yöntemleri de bu amaçla kullanılmaya başlanmıştır. Bu yöntemlerde 5-Bromo-2-deoxyuridine (BrdU) mevcudiyetinde 2 hücre siklusu geçiren hücrelerde BrdU Timidinin yerini almakta ve BrdU alan kromatidlerin boya bağlama kapasiteleri azalmaktadır. Sonuçta, bir iplikçiği ve her iki iplikçiği BrdU almış kromatidler oluşmakta, bu "eski" ve "yeni" kromatidler farklı boyanmaktadır (14).

BrdU mevcudiyetinde üretilen hücrelerde, hücre siklusunun S ve G₂ fazlarında bazı kromozom bölgelerinde despiralizasyon ortaya çıktığı ve bu etkinin doza bağlı olduğu gösterilmiştir(15). Despiralizasyonun DNA daki Timinin yerini BrdU almasından ziyade, kromozomlardaki DNA-protein kompleksinin modifikasyonuna bağlı olduğu ileri sürülmüştür. Aktif NOR bölgelerinde ortaya çıkacak bu şekildeki bir modifikasyonun NOR'ların fonksiyonunu değiştirerek SA frekansı üzerine etkili olabileceği öne sürülmüştür (16,17).

Bunun ötesinde, SA frekansını inceleyen çeşitli araştırmalar yapılmış ve bu çalışmaların bazılarında farklı akrosentrik kromozomların asosiasyona katılımının tesadüfi olduğu, bazılarında ise tesadüfi olmadığı bildirilmiştir (18,19,20,21). Bu farklı görüşleri incelemek amacıyla mevcut çalışma düzenlenmiş ve farklı BrdU konsantrasyonlarının SA frekansı ve asosiasyonda işe karışan kromozom grupları ile asosiasyon tipi üzerine olan etkileri incelenmiştir.

MATERYAL ve METOD

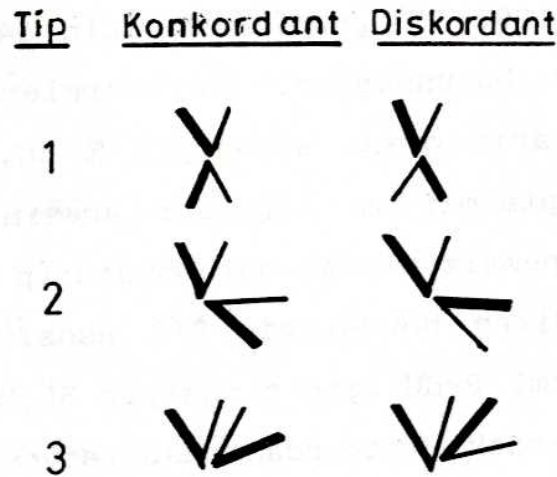
Sağlıklı gebelik geçiren annelerden doğan, 5 kız ve 5 erkekten oluşan toplam 10 bebekten heparinlenmiş enjektör ile kordon kanı alındı. Alınan örnekler % 20 FCS, % 3 PHA ve antibiyotik içeren Mc Coy's 5A (Gibco) besi ortamına steril koşullarda ilave edildi. Her bir birey için 4 ayrı kültür ortamı hazırlandı ve 37°C de 72 saat inkübe edildi (22). Üreme periyodunun ilk 24. saatinde kültür şişelerinden üçüne sırasıyla 10, 20, 40 µg/ml BrdU ilave edilip, ışığın fotolitik etkisinden korumak amacıyla aliminyum kağıtlara sarıldı. BrdU ilave edilmeyen bir kültür şişesi kontrol olarak değerlendirilmek üzere inkübe edildi. Bütün kültürlerle üreme süresinin son iki saatinde 0.1 µg/ml Colchicine (Gibco) ilave edildi. 0.075 M KCl ile 8 dakikalık muameleden sonra üreyen hücreler 3:1 Metanol: Asetik asit ile tesbit edildi. Taze hazırlanmış fiksatif solusyonu ile 3 kez yıkanan hücreler temiz ve kuru lamlara yayılıp havada kurutuldu.

Kontrol kültürlerinden hazırlanan preparatlar % 5 lik Giemsa ile boyandı. BrdU ilavesi ile hazırlanan kültürlerden elde edilen metafaz kromozomları koyu ve açık boyanan kromatidleri ayırt edebilmek amacıyla Korenberg ve Freedlander'in (23) önerdiği şekilde boyandı. Bunun için; 1-3 gün oda sıcaklığında bekletilen preparatlar 1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (pH= 8.0-8.1) solusyonu içinde 88°C de 10 dk bekletildi. Hızla distile sudan geçirilen preparatlar 5-7 dk % 5 lik Giemsa ile boyandı, Entellan (Merck) ile kapatıldı.

Kontrol kültürlerinden elde edilen preparatlarda iyi dağılmış 50 metafazın kromozomlarında SA ları sayıldı ve asosiasyonlarda işe karışan kromozom grupları ile asosiasyon tipi tesbit edildi. BrdU ilavesiyle hazırlanan kültürlerden elde edilen preparatlarda da, koyu ve açık boyanmış kromatid-

lere sahip, iyi dağılmış 50 metafazda akrosentrik kromozomlardaki SA ları özel olarak hazırlanmış formlara kaydedildi. Sayımlarda hataya düşmemek için 46 kromozomu tam olan metafazlar değerlendirildi.

Değerlendirmelerde, iki akrosentrik kromozom arasındaki mesafe 1 kromatidden daha az ise bu kromozomlar asosiasyonlu olarak kabul edildi. Asosiasyonlar, kromozomların yerleşimlerine bağlı olarak 3 tipe ayrıldı: İki akrosentrik kromozom uç uca eşlenmiş ise Tip 1; akrosentrik kromozomlar arasındaki açı 90° - 180° ise Tip 2; kromozomlar hemen hemen yan yana bir yerleşim gösteriyorsa Tip 3 olarak değerlendirildi (Şekil-1). Her 3 tip asosiasyon da asosiye olmuş kromozomların gruplarına göre D/D, D/G, G/G olarak sınıflandırıldı. BrdU almış metafazlarda sayılan tüm asosiasyonlarda, karşı karşıya gelen kromatidleri aynı boyananlar konkordant; karşı karşıya gelen kromatidleri farklı boyananlar diskordant olarak tanımlandı. Kardeş kromatid değişimi olan kromozomların işe karıştığı asosiasyonlar değerlendirmeye alınmadı.



Şekil-1: Üç tip asosiasyonda konkordant ve diskordant kromozomların pozisyonları.

BULGULAR

BrdU ilave edilmeyen kontrol kültürlerinden elde edilerek incelenen toplam 500 hücrede 387 SA gözlenmiştir. 10,20 ve 40 $\mu\text{g/ml}$ BrdU ilave edilen kültürlerde ise bu değerlerin sırasıyla 285, 293, 311 olduğu ve değerler arasındaki farkların istatistiksel olarak önemsiz olduğu saptanmıştır ($p > 0.05$), (Tablo I).

BrdU konsantrasyonunun SA larının kromozom gruplarına göre dağılımına ve asosiasyon simetrisine etki edip etmediğini incelemek üzere yapılan değerlendirme sonuçları tablo II de verilmiştir. Buna göre; 10 $\mu\text{g/ml}$ BrdU ilave edilen hücrelerde toplam 91; 20 $\mu\text{g/ml}$ BrdU ilave edilen hücrelerde toplam 97; 40 $\mu\text{g/ml}$ BrdU ilave edilen hücrelerde ise toplam 112 D/D asosiasyonu gözlenmiştir. Bu hücrelerdeki konkordant asosiasyonların oranının sırasıyla % 53,84; % 54,63; %54,46 olduğu görülmüş ve değerler arasındaki farkın istatistiksel olarak önemsiz olduğu anlaşılmıştır ($p > 0.05$). Aynı hücrelerde gözlenen toplam D/G asosiasyonlarının sayısı 10 $\mu\text{g/ml}$ BrdU ilave edilen hücreler için 139, 20 $\mu\text{g/ml}$ BrdU için 142, 40 $\mu\text{g/ml}$ BrdU için 141 olarak bulunmuştur. Bu hücrelerde gözlenen konkordant asosiasyonların oranı sırasıyla % 50,35; % 59,15 ve % 42,55 olarak saptanmış ve değerler arasındaki farkın istatistiksel olarak önemsiz olduğu bulunmuştur ($p > 0.05$). Aynı şekilde BrdU ilave edilen hücrelerde G/G asosiasyonlarının sayısı 10,20 ve 40 $\mu\text{g/ml}$ BrdU için sırasıyla 55,54,58 olarak saptanmıştır. Bu hücrelerdeki konkordant asosiasyonların oranı % 45,45; % 55,55; % 46,55 olarak hesaplanmıştır. Değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir ($p > 0,05$), (Tablo II).

Tablo-I: Çeşitli BrdU konsantrasyonlarında gözlenen SA frekansı.

BrdU Kon. ($\mu\text{g/ml}$)	İncelenen Hücre	Asosiasyonlu Hüc. Sayısı	Asosiasyonlu Sayısı	P
0	500	268	387	> 0,05
10	500	212	285	> 0,05
20	500	223	293	> 0,05
40	500	236	311	> 0,05

Tablo-II: Toplam asosiasyonların BrdU dozu ve kromozom gruplarına göre dağılımı.

BrdU Kon. ($\mu\text{g/ml}$)	Kromozom Grubu	Toplam Asosiasyon	Konkordant Asosiasyon	% Konkordant Aso.	P
10		91	49	53,84	> 0,05
20	D/D	97	53	54,63	> 0,05
40		112	61	54,46	> 0,05
	Toplam:	300	163	54,33	
10		139	70	50,35	> 0,05
20	D/G	142	84	59,15	> 0,05
40		141	60	42,55	> 0,05
	Toplam:	422	214	50,71	
10		55	25	45,45	> 0,05
20	G/G	54	30	55,55	> 0,05
30		58	27	46,55	> 0,05
	Toplam:	167	82	49,10	

BrdU konsantrasyonunun asosiasyon tipine ve asosiasyon simetrisine etki etmediğini incelemek üzere yapılan değerlendirme sonuçları tablo III'de verilmiştir. Buna göre; 10, 20 ve 40 $\mu\text{g/ml}$ BrdU ilave edilen hücrelerde sırasıyla toplam 106, 109 ve 98 Tip 1 asosiasyonu gözlenmiş ve bu asosiasyonların % 47,16, % 55,04 ve % 45,91'inin konkordant olduğu anlaşılmıştır. Değerler arasındaki fark önemsizdir ($p > 0,05$). Aynı değerler Tip 2 ve Tip 3 asosiasyonları için de hesaplanmış ve her iki tipde de konkordant asosiasyon oranlarının önemli bir değişiklik göstermediği saptanmıştır ($p > 0,05$), (Tablo III).

Tablo-III: Toplam asosiasyonların BrdU konsantrasyonu ve asosiasyon tipine göre dağılımı.

BrdU Kon. ($\mu\text{g/ml}$)	Asosiasyon Tipi	Toplam Asos. Sayısı	Konkordant As. Sayısı	Konkordant Asos. %	P
10		106	50	47,16	> 0,05
20	Tip 1	109	60	55,04	> 0,05
40		98	45	45,91	> 0,05
	Toplam:	313	155	49,52	
10		156	81	51,92	> 0,05
20	Tip 2	164	96	58,53	> 0,05
40		186	92	49,46	> 0,05
	Toplam:	506	269	53,16	
10		23	13	56,52	> 0,05
20	Tip 3	20	11	55,00	> 0,05
40		27	11	40,74	> 0,05
	Toplam:	70	35	50,00	

TARTIŞMA

Hücre bölünmesinin anafaz evresinde kromozomların bağımsız olarak ayrıldığı temelde kabul edilmekle birlikte, metafaz evresinde NOR taşıyan akrosentrik kromozomların kısa kollarının sıklıkla asosiasyon halinde olduğu görülmektedir. Bazı araştırmacılar, bir nükleolusun oluşmasında NOR taşıyan birden fazla kromozom işe karıştığı ve bu kromozomların pozisyonları sonraki metafazlarda korunduğu için SA larının ortaya çıktığını öne sürmüşlerdir (1-5). SA larına farklı akrosentrik kromozomların katılımının tesadüfi olduğunu ve tesadüfi olmadığını bildiren çalışmalar mevcuttur. Schmid ve arkadaşları (24), sekonder darlıkların büyüklüğü ve NOR aktivitelerinin SA frekansı üzerine etki edebileceğini göstermişlerdir. Benzer bulgular DNA-RNA in situ hibridizasyon metodu kullanılarak Warburton ve arkadaşlarınca (25) da bildirilmiştir ve daha fazla miktarda rDNA içeren NOR ların SA da daha sıklıkla işe karıştığı vurgulanmıştır. Miller ve arkadaşları (26) da insan lenfosit kültürlerindeki SA frekansının NOR ların aktivitesi ile ilişkili olabileceğini göstermişlerdir. Bununla birlikte, lenfosit ve fibroblast gibi farklı doku kültürlerinde SA frekansının farklı olduğu bildirilmiş (13) ve SA frekansları arasındaki farkların NOR aktivitelerindeki farklar dışındaki etkenlerle de ortaya çıkabileceği ileri sürülmüştür.

BrdU kullanılarak yapılan çalışmalarda hücre siklusunun sayısı arttıkça SA frekansının belirgin olarak azaldığı gösterilmiştir. Bu azalmanın sebebi, 2. ve 3. mitozlarda geçirilen interfazın, 1. mitozun interfazından daha kısa olması ve kısa interfazlarda kromozom pozisyonlarına bağlı olarak SA ihtimalinin azalması şeklinde açıklanmıştır (21).

BrdU ilave edilmiş ve aynı hücre siklusunu geçirmekte olan hücrelerin incelendiği Bobrow ve Heritage'in (18) çalışmalarında, uç uca asosiasyon yapmış olan akrosentrik

kromozomların kromatidlerinin mitotik metafazda tesadüfi olmayan bir şekilde dizildiği ve sonraki hücre bölünmesinde tesadüfi olmayan davranış gösterdiği ortaya konmuştur. Bu araştırmacılar BrdU mevcudiyetinde 2 ve 3 üreme siklusu geçiren hücrelerde iki kromozomun işe karıştığı akrosentrik asosiasyon oranının % 83 olduğunu ve konkordant asosiasyonların % 50 lik beklenenden önemli derecede sapma gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu durumda, gözlenen tesadüfi-olmayan SA ların muhtemelen BrdU'in kendi etkisi ile ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür.

Buna karşın, Donahue ve Jacobs (19) BrdU ilave edilen kültürlerde gözledikleri SA larının % 51 inin konkordant olduğunu; ne BrdU konsantrasyonunun ne de asosiasyon tipinin SA larının tesadüfiliği üzerine etki etmediğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda da 10, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$ BrdU ilave edilen ve BrdU ilave edilmeyen hücrelerde SA frekansları arasında önemli farklılıklar mevcut olmadığı saptanmıştır. Belirli dozlarda BrdU ilave edilen hücrelerde de BrdU dozuna bağlı olarak konkordant asosiasyonların beklenen % 50 lik orandan önemli bir sapma göstermediği anlaşılmıştır. Bu bulgumuz, 10-25 μM BrdU mevcudiyetinde üretilen lenfositlerde SA frekansının kontrollerine göre önemli bir artış göstermediğini bildiren Beek ve Sigmund'un (21,27) bulguları ile uyumludur. Böylece, bu araştırmacıların öne sürdüğü, DNA daki Timidin'in yerini alan BrdU in kendisinin SA frekansını artırmadığı görüşü desteklenmiştir. Ancak Musilova ve arkadaşları (17) 250 μM BrdU dozunda SA frekansının arttığını gözlemişler ve bu durumun BrdU in

kendi etkisi ile değil, NOR lardaki protein - DNA kompleksinin modifikasyonuna bağlı olabileceğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda bu görüşü ele alacak dozda BrdU kullanılmamış olup, kullanılan BrdU dozlarında SA frekansında önemli değişiklikler olmadığı saptanmıştır.

Benzer şekilde, çeşitli dozlarda BrdU ilave edilen hücrelerde farklı kromozom grupları ve farklı asosiasyon tiplerinde gözlenen konkordant asosiasyon oranlarının önemli bir artış göstermediği saptanmıştır. Bu bulgularımız, yalnızca uç uca eşleşmiş asosiasyonları ele alan ve asosiasyonların tesadüfi olmadığını öne süren Bobrow ve Heritage'ın (18) bulguları ile uyumsuz görünmekle birlikte, Donahue ve Jacobs (19) un bulgularını desteklemektedir. SA larının incelenmesinde gözlenen asosiasyon oranları üzerine değerlendirmeye alınan asosiasyon tipinin önemli olabileceğini ve sayımlarda tek tip asosiasyonların ele alınmasının konkordant asosiasyonların frekansını göreceli olarak artırabileceği bildirilmiştir (19). Bu nedenle çalışmamızda, seçimdeki hatalardan kaçınmak amacıyla Donahue ve Jacob's un önerdiği şekilde tüm asosiasyonlar sayılmış ve pozisyonlarına göre sınıflandırılmıştır. Böylece, bir asosiasyon tipindeki artma, diğer bir asosiasyon tipinin azalmasına neden olacaktı. Buna rağmen, her 3 tip asosiasyonda da konkordant ve diskordant asosiasyon oranları arasında önemli bir fark saptanamamıştır. Sonuçta, BrdU mevcudiyetinde üretilen hücrelerde, akrosentrik kromozomlardaki kromatidlerin tesadüfi davranmadığına ilişkin herhangi bir delil elde edilememiştir.

KAYNAKLAR

- 1- Bloom, S.E., Goodpasture, C.: An improved technique for selective silver staining of Nucleolar Organizer Regions in human Chromosomes. *Hum. Genet.* 34: 199-206, 1976.
- 2- Henderson, A.S., Warburton, D., Atkwood, K.C.: Location of ribosomal DNA in Human Chromosome complement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69:3394-3398, 1972.
- 3- Evans, H.J., Buckland, R.A., Pardue, M.L.: Location of gene coding for 18 S and 28 S ribosomal RNA in the human genome. *Chromosoma* 48: 405-426, 1974.
- 4- Balicek, P., Zizka, J., Skalska, H.: RHG-Band polymorphism of the short arms of human acrocentric chromosomes and relation-ship of variants to satellite associations. *Human Genet.* 62: 237-239; 1982.
- 5- Ferguson-Smith, M.A., Handmaker, D.: Observations on satellit human chromosomes. *Lancet* 1: 638-640, 1961.
- 6- Cohen, M.M., Shaw, M.W.: The association of acrocentric chromosomes in 1000 normal human male metaphases. *Ann. Hum. Genet.* 31:129-140, 1967.
- 7- Prokofieva-Belgovskaya, A.A., Gindilis, V.M., et al.: Association of acrocentric chromosomes in relation to cell type and age of individuals. *Exp. Cell Res.* 49:612-625, 1968.
- 8- Zankı, H. Zang, K.D.: Quantitative studies on the arrangement of human metaphase chromosomes. IV. The association frequency of human acrocentric marker chromosomes. *Humangenetik* 23:259-265, 1974.

- 9- Mattei, J.F., Ayme, S., Mattei, M.G., et al.: Quantitative and qualitative study of acrocentric associations in 109 normal subjects. *Human Genet.* 34: 185-194, 1974.
- 10- Galperin-Lemailre, H., Hens, L., Sele, B.: Comparison of acrocentric associations in male and female cells. Relationship to the active nucleolar organizers. *Human Genet.* 54: 349-353, 1980.
- 11- Phillips, R.B.: Inheritance of acrocentric association patterns. *Humangenetik* 29: 309-318, 1975.
- 12- Zakharov, A.F., Davudov, A.Z., Benjush, V.A. and Egolina, N.A.: Genetic determination of NOR activity in human lymphocytes from twins. *Human Genet.* 60:24-29, 1982.
- 13- Mikelsaar, A.V., Schwarzacher, H.G.: Comparison of silver staining of nucleolus organizer regions in human lymphocytes and fibroblast. *Human Genet.* 42: 291-299, 1978.
- 14- Latt, S.A., Schreck, R.R.: Sister chromatid exchange analysis. *Am. J. Hum. Genet.* 32:297-313, 1980.
- 15- Zakharov, A.F., Seleznev, J.V., Benjusch, V.A., et al.: Differentiation along human chromosomes in relation to their identification. *Excerpta. Med. Intern. Congress Series*, 233: 191, 1971.
- 16- Dutrillaux, B.: The relationship between DNA replication and chromosome structure. *Human Genet.* 35:247-253, 1977.
- 17- Musilova, J., Michalova, K., Hoffmanova, H.: Increased satellite association induced by 5' Bromodeoxyuridine treatment of phytohemagglutinin-stimulated blood lymphocytes. *Human Genet.* 65: 91-93, 1983.
- 18- Bobrow, M., Heritage, J.: Nonrandom segregation of nucleolar organizing chromosomes at mitosis? *Nature*, Vol. 288: 79-81, 1980.

- 19- Donahue,R.P., Jacobs,P.A.: Chromatid associations in acrocentric chromosomes: Evidence against nonrandomness. *Am.J.Hum.Genet.*34:961-965, 1982.
- 20- Strobels,R.J., Pathak,S., Hsu,T.C.: NOR lateral asymmetry and its effect on satellite association in BrdU-labelled human lymphocyte cultures.*Human Genet.* 59: 259-262,1981.
- 21- Sigmund,J., Scharzacher,H.G., Mikelsaar,A.V.: Satellite association frequency and number of nucleoli depend on cell cycle duration and NOR- activity. *Human Genet.* 50:81-91, 1979.
- 22- Moorhead,P.S., Nowel,P.C., Mellman,W.J., et al.: Chromosome preparation of leucocytes cultured from human peripheral blood. *Exp.Cell Res.* 20:613-616, 1961.
- 23- Korenberg,J.R., Freedlender,E.F.: Giemsa technique for the detection of SCEs.*Chromosome(Berl.)*,48:355-360,1974.
- 24- Schmid,M., Korene,W., Vogel,W.: On the relationship between the frequency of association and the nucleolar constriction of individual acrocentric chromosomes. *Humangenetik* 23: 267-277, 1974.
- 25- Warburton,D., Atwood,R.C., Henderson,A.S.: Variation in the number of genes for rRNA among human acrocentric chromosomes: Corelation with frequency of satellite association. *Cytogenenet. Cell Genet.* 17: 221-230, 1976.
- 26- Miller,D.A., Tantravhi,R., Dev,V.G. Miller,O.J.: Frequency of satellite association of human chromosomes in corelated with amount of Ag-staining of the nucleolus organizer region. *Am.J.Hum.Genet.* 29:490-502, 1977.
- 27- Beek,B.: BrdU-Giemsa labelling and satellite association in human leucocytes. *Human Genet.* 59: 240-244, 1981.