



## Editöre Mektup Konu: Polimorfik X'e Bağlı Lokusların Olgu Kontrol Çalışmalarında Allel Frekansları Nasıl Tahmin Edilir ve İstatistiksel Karşılaştırmalar Nasıl Yapılır?

Letter to the Editor Re: How to Estimate Allele Frequencies and Make Statistical Comparisons in Case-Control Studies of Polymorphic X-Linked Loci

© Mostafa Saadat

Şiraz Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Şiraz, İran

### Anahtar Kelimeler

Allel frekansı, Hardy-Weinberg dengesi, polimorfizmler, X'e bağlı

### Keywords

Allele frequency, Hardy-Weinberg equilibrium, polymorphisms, X-linked

### Sayın Editör,

Yaylacıoğlu Tuncay ve ark.'nın<sup>1</sup> yakın zamanda *Türk Oftalmoloji Dergisi*'nde yayımlanan "Oftalmopati Eşlik Eden ve Etmeyen Graves Hastalığında *FOXP3* Polimorfizmlerinin Türk Popülasyonundaki Rolü" başlıklı makalesini büyük bir ilgiyle okudum. Yazarlar, oftalmopati görülen veya görülmeyen Graves hastalarını ve Graves hastaları ve kontrolleri üç *FOXP3* polimorfizmi (rs3761549, rs3761548 ile rs3761547) açısından karşılaştırmıştır.

Yazarların belirttiği gibi, forkhead box P3 (*FOXP3*, MIM: 300292) geninin insan kromozomu Xp11.23'de yer aldığı bilinmektedir. Erkeklerin ve kadınların sırasıyla bir ve iki X kromozomuna sahip olduğu göz önüne alındığında, genotipik paternler iki cinsiyet için oldukça farklıdır. Kadınların üç genotipi varken (iki homozigot ve bir heterozigot) ve erkeklerin sadece iki hemizigot genotipi bulunmaktadır. Bu nedenle cinsiyet gruplarının genotiplerini bir araya getirmek imkansızdır. Ne yazık ki, yazarlar her iki cinsiyetin genotiplerini bir araya getirerek önemli bir hata yapmışlardır. Bu nokta tarafımdan daha önce tartışılmıştır.<sup>2</sup> Ancak, aşağıdaki noktaları açıklamanın gerekli olduğunu düşünüyorum: 1) Allel frekanslarını nasıl tahmin etmeliyiz? ve 2) bu tür lokuslarda olgu-kontrol çalışmalarında istatistiksel karşılaştırmaları nasıl yapmalıyız?

Genetik İlişkilendirme Çalışma Raporlarının Güçlendirilmesi ("STrengthening the REporting of Genetic Association studies") yönergesine göre, genetik ilişkilendirme çalışmalarında, araştırmacılar Hardy-Weinberg dengesine (HWD) dayanarak gözlemlenen ve beklenen genotipik değerleri karşılaştırmalıdır.<sup>3</sup>

X'e bağlı bir polimorfik lokusta iki  $A_1$  ve  $A_2$  allel olduğunu varsayalım. Kadınlarda  $A_1A_1$ ,  $A_1A_2$  ve  $A_2A_2$  genotiplerinin

**Cite this article as:** Saadat M. Letter to the Editor Re: How to Estimate Allele Frequencies and Make Statistical Comparisons in Case-Control Studies of Polymorphic X-Linked Loci. *Türk J Ophthalmol.* 2024;54:246-247

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Mostafa Saadat, Şiraz Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Şiraz, İran  
E-posta: saadat@shirazu.ac.ir ORCID-ID: orcid.org/0000-0002-0021-4055  
Geliş Tarihi/Received: 03.07.2024 Kabul Tarihi/Accepted: 03.08.2024

DOI: 10.4274/tjo.galenos.2024.55507



frekansları sırasıyla “a”, “b” ve “c” ve erkeklerde  $A_1$  ve  $A_2$  hemizigot genotiplerinin frekansları “d” ve “e” ise allel frekansı sayma yöntemi ile hesaplanabilir. Kadın ve erkek sayısı sırasıyla  $n_1$  (=a+b+c) ve  $n_2$  (=d+e)’ye eşittir.  $A_1$  ve  $A_2$  allel frekansları sırasıyla p ve q ile gösterilir ve aşağıdaki formüller kullanılarak tahmin edilir:

$$p = \frac{2a+b+d}{2n_1+n_2}$$

$$q = \frac{b+2c+e}{2n_1+n_2}$$

Daha sonra, kadın örneklerinde tahmin edilen p ve q kullanılarak hesaplanan  $A_1A_1$ ,  $A_1A_2$ , ve  $A_2A_2$  genotipleri için beklenen değerler sırasıyla  $p^2$ ,  $2pq$  ve  $q^2$ 'ye eşit olur. Son olarak, genotipler için gözlemlenen ve beklenen değerler ki-kare testi kullanılarak karşılaştırılmalıdır. Serbestlik derecesi 1’dir.

Cinsiyetler arasında X kromozomlarının sayısı farklılık gösterdiğinden, olguları kontrollerle karşılaştırmak için (olgu-kontrol çalışmalarında) katılımcılar cinsiyete göre sınıflandırılmalıdır. Bununla birlikte, allelik frekans yukarıda açıklanan şekilde tahmin edildiğinde, cinsiyetten bağımsız olarak tüm olgu ve kontroller arasında allelik frekansları (genotipik frekansları değil) karşılaştırmak mümkündür.

Yaylıoğlu Tuncay ve ark.’nın<sup>1</sup> çalışmasına her iki cinsiyetten bireylerin dahil edildiği göz önüne alındığında, bildirilen sonuçların dikkatle yorumlanması gerekir. Yazarların, her polimorfizmin genotipleri hakkındaki verilerini cinsiyete göre sunmaları ve yukarıda belirtilen önemli noktaları ele alarak verilerini yeniden analiz etmeleri önerilir. Daha önce bildirildiği üzere,<sup>3,4,5</sup> araştırmacılar ayrıca gözlemlenen genotiplerin frekanslarının HWD’ye göre beklenen frekanslarından anlamlı düzeyde farklı olmadığını göstermelidir. Değerli yazarlara araştırmalarında başarılar diliyorum.

#### Etik

**Finansal Destek:** Yazar tarafından finansal destek almadığı bildirilmiştir.

#### Kaynaklar

1. Yaylıoğlu Tuncay F, Serbest Ceylanoğlu K, Güntekin Ergün S, Ergün G, Konuk O. The Role of *FOXP3* Polymorphisms in Graves’ Disease with or without Ophthalmopathy in a Turkish Population. *Turk J Ophthalmol.* 2024;54:69-75.
2. Saadat M. Letter to the Editor on “Serum concentration of interleukin-35 and its association with tumor stages and FOXP3 gene polymorphism in patients with prostate cancer (Cytokine, 113 (2019), pp. 221-227)”. *Cytokine.* 2020;135:155236.
3. Little J, Higgins JP, Ioannidis JP, Moher D, Gagnon F, von Elm E, Khoury MJ, Cohen B, Davey-Smith G, Grimshaw J, Scheet P, Gwinn M, Williamson RE, Zou GY, Hutchings K, Johnson CY, Tait V, Wiens M, Golding J, van Duijn C, McLaughlin J, Paterson A, Wells G, Fortier I, Freedman M, Zecevic M, King R, Infante-Rivard C, Stewart A, Birkett N. Strengthening the Reporting of Genetic Association studies (STREGA)-an extension of the STROBE statement. *Eur J Clin Invest.* 2009;39:247-266.
4. Saadat M. The importance of examining the Hardy-Weinberg Equilibrium in genetic association studies. *Mol Biol Res Commun.* 2024;13:1-2.
5. Saadat M. Evaluation of Hardy-Weinberg equilibrium in genetic association studies. *Int J Immunogenet.* 2024;51:183-186.

#### Yanıt

Öncelikle makalemizi değerlendirdiği için yazara teşekkür ederiz.<sup>1</sup> Hem yazar tarafından hem de yazımızda belirtildiği üzere Forkhead box P3 (*FOXP3*) geni X kromozomu üzerinde yer almaktadır. Bildiğimiz kadarıyla, literatürdeki on farklı çalışmada, *FOXP3* polimorfizmleri ile Graves hastalığı (GH) gelişimi arasındaki ilişki araştırılmıştır.<sup>2,3,4,5,6,7,8,9,10,11</sup> Bu raporlardan yedisi her iki cinsiyeti bir arada değerlendirerek genotip ve allel frekanslarını sunmuş,<sup>2,3,4,5,6,7,8</sup> ve geri kalan çalışmalar ise hastaları cinsiyete göre gruplandırarak genotip ve allel frekanslarını kadınlar ve erkekler için ayrı ayrı bildirmiştir.<sup>9,10,11</sup> Makalemizde, Türk popülasyonunda oftalmopati görülen ve görülmeyen GH’de *FOXP3* polimorfizmlerinin frekanslarını değerlendirmeyi amaçladık.<sup>1</sup> Çalışmamızda her gruptaki hasta sayısı sınırlı olduğu ve daha önce yayımlanan makalelere herhangi bir düzeltme olmadığı için,<sup>2,3,4,5,6,7,8</sup> grupları cinsiyete göre sınıflandırmadık ve polimeraz zincir reaksiyonu-restriksiyon fragman uzunluğu polimorfizmi (PCR-RFLP) sonuçlarını doğrudan genotip ve allel frekanslarını analiz etmek için kullandık.<sup>1</sup> PCR-RFLP yönteminde, sonuçlar bant paternleri şeklinde görünür ve bu paternler, örnekte ilgili genin bir veya iki allele sahip olup olmadığını göstermezler. Ek olarak, aynı analiz yöntemini kullanarak, sonuçlarımızı grupları cinsiyete göre sınıflandırmayan yedi raporla karşılaştırma imkanı bulduk.

Ancak, yazarın belirttiği gibi, erkekler bir ve kadınlar iki X kromozomuna sahip olduğundan, genotip paternleri iki cinsiyet arasında farklılık göstermektedir. Kadınlarda üç genotip (iki homozigot ve bir heterozigot), erkeklerde ise sadece iki hemizigot genotip bulunmaktadır. Bu nedenle, grupların cinsiyete göre sınıflandırılması ve X’e bağlı genler için kadın ve erkeklerde ayrı ayrı genotip ve allel frekanslarının hesaplanması yararlı olacaktır. Ayrıca yazar mektubunda Hardy-Weinberg dengesine (HWD) dayalı gözlenen ve beklenen genotip frekans değerlerinin karşılaştırılmasının önemini vurgulamış ve X’e bağlı polimorfik lokus için formülünü açıklamıştır. Yazar tarafından bildirilen endişelere yanıt vermek adına, bu yanıtta, Tablo 1, 2, 3 ve 4’te gösterildiği gibi grupları cinsiyete göre sınıflandırarak ek analizler yaptık.

İlk olarak, yazarın önerdiği gibi hem kontrol hem de çalışma gruplarında HWD analizi yaptık. Gözlenen genotiplerin frekansları, kadın kontrol gruplarındaki tüm tek nükleotit polimorfizmleri (TNP) için HWD’ye göre beklenen genotip frekanslarından anlamlı farklı değildi ( $rs3761547$ ,  $p=0,926$ ;  $rs3761548$ ,  $p=0,881$ ; ve  $rs3761549$ ,  $p=0,926$ ).

İkinci olarak, gruplar cinsiyete göre sınıflandırıldığında, kadın çalışma grubumuzda -3279’un ( $rs3761548$ ) AC ve AA genotipleri ve -2383’ün ( $rs3761549$ ) CT genotipinin sıklığının anlamlı düzeyde arttığını bulduk (Tablo 1). Ek olarak, -3279 A alleli, hem kadın (Tablo 1) hem de erkek çalışma gruplarında (Tablo 3) ayrı ayrı karşılaştırıldığında veya cinsiyetten bağımsız olarak kontroller ve hastalar arasında karşılaştırıldığında (Tablo 4)