

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:

$$p = (2a+b+d)/(2n_1+n_2)$$

$$q = (b+2c+e)/(2n_1+n_2)$$

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.

Yaylıcıoğlu Tuncay ve ark.’nın¹ 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,^{3,4,5} 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. Yaylıcıoğlu 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.¹ 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.^{2,3,4,5,6,7,8,9,10,11} Bu raporlardan yedisi her iki cinsiyeti bir arada değerlendirerek genotip ve allel frekanslarını sunmuş,^{2,3,4,5,6,7,8} ve geri kalan çalışmalar ise hastaları cinsiyete göre gruplandırarak genotip ve allel frekanslarını kadınlar ve erkekler için ayrı ayrı bildirmiştir.^{9,10,11} Makalemizde, Türk popülasyonunda oftalmopati görülen ve görülmeyen GH’de *FOXP3* polimorfizmlerinin frekanslarını değerlendirmeyi amaçladık.¹ Çalışmamızda her gruptaki hasta sayısı sınırlı olduğu ve daha önce yayımlanan makalelere herhangi bir düzeltme olmadığı için,^{2,3,4,5,6,7,8} grupları cinsiyete göre sınıflandırmadık ve polimeraz zincir reaksiyonu-restriksiyon fragman uzunluğu polimorfizmi (PCR-RFLP) sonuçlarını doğrudan genotip ve allel frekanslarını analiz etmek için kullandık.¹ 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)

Tablo 1. Kadın çalışma ve kontrol gruplarında *FOXP3* TNP'lerinin genotip ve allel dağılımları

Genotip	Kontrol grubu n=68	Çalışma grubu (GO görülme-yen/GO) n=130	p değeri	OO (%95 GA)
rs3761548 -3279 C/A				
CC	39 (%57)	30 (%23)	-	1,0*
AC	26 (%38)	74 (%57)	<0,0001	3,7 (1,9-7,1)
AA	3 (%5)	26 (%20)	<0,0001	11,26 (3,1-40,8)
Allel				
C	104 (%76)	134 (%51)	-	1,0*
A	32 (%24)	126 (%49)	<0,0001	3,05 (1,9-4,8)
rs3761549 -2383 C/T				
CC	58 (%85)	89 (%68)	-	1,0*
CT	10 (%15)	35 (%27)	0,03	2,28 (1,04-4,9)
TT	0 (%0)	6 (%5)	-	-
Allel				
C	126 (%93)	210 (%81)	-	1,0*
T	10 (%7)	50 (%19)	<0,0001	3 (1,4-6,1)
rs3761547 -3499 A/G				
AA	58 (%85)	103 (%79)	-	1,0*
AG	10 (%15)	26 (%20)	0,34	1,4 (0,65-3,24)
GG	0	1 (%1)	-	-
Allel				
A	126 (%93)	232 (%89)	-	1,0*
G	10 (%7)	28 (%11)	0,27	1,5 (0,71-3,23)

*Referans değeri için ilk allel ya da genotip (-3279 C/A için CC, -2383 C/T için CC, -3499 A/G için AA) dikkate alınmıştır. TNP: Tek nükleotit polimorfizmleri, GO: Graves oftalmopatisi, OO: Olasılık oranı, n: Sayı, GA: Güven aralığı. Genotiplerin ve alellerin frekansları ki-kare testi kullanılarak karşılaştırıldı. Koyu değerler istatistiksel olarak anlamlıdır

Tablo 2. GO görülen ve görülme-yen kadın hastalarda *FOXP3* TNP'lerin genotip ve allel dağılımları

Genotip	GO görülme-yen n=56	GO n=74	p değeri	(%95 GA)
-3279 C/A				
CC	10 (%17,9)	17 (%23,0)	0,47	1,38 (0,5, 3,2)
AC	34 (%60,7)	40 (%54,0)	0,44	0,8 (0,38, 1,5)
AA	12 (%21,4)	17 (%23,0)	0,84	1,09 (0,4, 2,5)
Allel			0,77	1,07 (0,65, 1,7)
A	54 (%48,2)	74 (%50)		
C	58 (%51,8)	74 (%50)		
-2383 C/T				
CC	42 (%75,0)	47 (%63,5)	0,16	0,58 (0,26, 1,25)
CT	10 (%17,9)	25 (%33,8)	0,06	2,4 (0,98, 5,41)
TT	4 (%7,1)	2 (%2,7)	0,07	0,24 (0,05, 1,24)
Allel			0,46	0,78 (0,42, 1,50)
C	94 (%81,0)	119 (%80,4)		
T	18 (%19,0)	29 (%19,6)		
-3499 A/G				
AA	44 (%78,6)	59 (%79,7)	0,52	1,1 (0,46, 2,52)
AG	12 (%21,4)	14 (%18,9)	0,71	0,86 (0,36, 2,02)
GG	0	1 (%1,4)	-	-
Allel			0,57	0,99 (0,4, 2,19)
A	100 (%86,2)	132 (%89,2)		
G	12 (%13,8)	16 (%10,8)		

TNP: Tek nükleotit polimorfizmleri, GO: Graves oftalmopatisi, OO: Olasılık oranı, n: Sayı, GA: Güven aralığı. Genotiplerin ve alellerin frekansları ki-kare testi kullanılarak karşılaştırıldı

Tablo 3. Erkek çalışma ve kontrol gruplarının allel dağılımları

Allel	Kontrol grubu n=32	Çalışma grubu (GO görülmeyen/GO) n=44	p değeri	OO (%95 GA)
rs3761548				
C	27 (%84)	20 (%45)	-	1,0 ^a
A	5 (%16)	24 (%55)	<0,0001	6,8 (2,1-19)
rs3761549				
C	30 (%94)	42 (%95)	-	1,0 ^a
T	2 (%6)	2 (%5)	0,74	2,3 (1,2-4,2)
rs3761547				
A	30 (%94)	44 (%100)	-	-
G	2 (%6)	0 (%0)	-	-

^aListelenen ilk allel referans değeri olarak kabul edildi. GO: Graves oftalmopatisi, OO: Olasılık oranı, n: Sayı, GA: Güven aralığı. Allellerin frekansları ki-kare testi kullanılarak karşılaştırıldı. Koyu değerler istatistiksel olarak anlamlıdır

Tablo 4. Çalışma ve kontrol gruplarının cinsiyetten bağımsız allel dağılımları

Allel	Kontrol grubu n=168	Çalışma grubu (GO görülmeyen/GO) n=304	p değeri	OO (%95 GA)
rs3761548				
C	131 (%78)	154 (%51)	-	1,0 ^a
A	37 (%22)	150 (%49)	<0,0001	3,4 (2,24-5,2)
rs3761549				
C	156 (%93)	252 (%83)	-	1,0 ^a
T	12 (%7)	52 (%17)	0,0025	2,3 (1,2-4,2)
rs3761547				
A	156 (%93)	276 (%91)	-	1,0 ^a
G	12 (%7)	28 (%9)	0,43	1,31 (0,65-2,67)

^aListelenen ilk allel referans değeri olarak kabul edildi. GO: Graves oftalmopatisi, OO: Olasılık oranı, n: Sayı, GA: Güven aralığı. n=2 x kadın sayısı + erkek sayısı. Allellerin frekansları ki-kare testi kullanılarak karşılaştırıldı. Koyu değerler istatistiksel olarak anlamlıdır

anlamlı düzeyde artmıştır. T alleli -2383 frekansı, ayrı ayrı karşılaştırıldığında kadın çalışma grubumuzda (Tablo 1) ve cinsiyetten bağımsız olarak karşılaştırıldığında tüm çalışma örnekleminde anlamlı düzeyde artmıştır (Tablo 4). Ancak ayrı ayrı karşılaştırıldığında T alleli -2383 frekansı erkek çalışma grubumuzda anlamlı artış göstermemiştir (Tablo 3). Polimorfizm -3449 (rs3761547) allel ve genotip frekans dağılımı, kontrol ve çalışma grupları arasındaki herhangi bir karşılaştırmada anlamlı farklılık göstermedi (Tablo 1, Tablo 3 ve Tablo 4).

Üçüncü olarak, üç *FOXP3* TNP'sinin her birinin Graves oftalmopatisi (GO) görülen ve oftalmopati görülmeyen (GO görülmeyen) GH'li kadın hastalar arasındaki genotip ve allel dağılımları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu (Tablo 2).

Sonuç olarak, yayımlanan makalemizdeki sonuçlar ile katılımcıları cinsiyete göre gruplandırarak yapılan analiz sonuçları benzerdi. Ancak, yazarın mektubunda vurguladığı gibi, X-kromozomundaki polimorfik lokuslar, otozomal kromozomlardaki lokuslardan farklı olarak analiz edilmelidir. Bu nedenle, yazmış olduğu mektup ve ona yanıtımız, X'e bağlı

polimorfik lokuslarla ilişkileri araştırarak araştırmacılar için yararlı olacaktır.

Etik

Yazarlık Katkıları

Cerrahi ve Medikal Uygulama: K.S.C., B.T., O.K., Konsept: F.Y.T., K.S.C., S.G.E., O.K., Dizayn: F.Y.T., K.S.C., S.G.E., O.K., Veri Toplama veya İşleme: F.Y.T., K.S.C., S.G.E., Analiz veya Yorumlama: F.Y.T., K.S.C., S.G.E., Literatür Arama: F.Y.T., K.S.C., Yazan: F.Y.T., K.S.C., S.G.E.

Çıkar Çatışması: Yazarlar bu makale ile ilgili olarak herhangi bir çıkar çatışması bildirmemiştir.

Finansal Destek: Çalışmamız için hiçbir kurum ya da kişiden finansal destek alınmamıştır.

Kaynaklar

1. Yaylacıoğlu 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. Yu M, Tan X, Huang Y. Foxp-3 variants are associated with susceptibility to Graves' disease in Chinese population. *Eur J Inflamm*. 2017;15:113-119.
3. Zheng L, Wang X, Xu L, Wang N, Cai P, Liang T, Hu L. Foxp3 gene polymorphisms and haplotypes associate with susceptibility of Graves' disease in Chinese Han population. *Int Immunopharmacol*. 2015;25:425-431.
4. Tan G, Wang X, Zheng G, Du J, Zhou F, Liang Z, Wei W, Yu H. Meta-analysis reveals significant association between *FOXP3* polymorphisms and susceptibility to Graves' disease. *J Int Med Res*. 2021;49:3000605211004199.
5. Shehjar F, Afroze D, Misgar RA, Malik SA, Laway BA. Association of FoxP3 promoter polymorphisms with the risk of Graves' disease in ethnic Kashmiri population. *Gene*. 2018;672:88-92.
6. Fathima N, Narne P, Ishaq M. Association and gene-gene interaction analyses for polymorphic variants in *CTLA-4* and *FOXP3* genes: role in susceptibility to autoimmune thyroid disease. *Endocrine*. 2019;64:591-604.
7. Inoue N, Watanabe M, Morita M, Tomizawa R, Akamizu T, Tatsumi K, Hidaka Y, Iwatani Y. Association of functional polymorphisms related to the transcriptional level of *FOXP3* with prognosis of autoimmune thyroid diseases. *Clin Exp Immunol*. 2010;162:402-406.
8. Li HN, Li XR, Du YY, Yang ZF, Lv ZT. The Association Between Foxp3 Polymorphisms and Risk of Graves' Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11:392.
9. Owen CJ, Eden JA, Jennings CE, Wilson V, Cheetham TD, Pearce SH. Genetic association studies of the *FOXP3* gene in Graves' disease and autoimmune Addison's disease in the United Kingdom population. *J Mol Endocrinol*. 2006;37:97-104.
10. Bossowski A, Borysewicz-Sańczyk H, Wawrusiewicz-Kurylonek N, Zasim A, Szałeki M, Wikiera B, Barg E, Myśliwiec M, Kucharska A, Bossowska A, Gościk J, Ziara K, Górka M, Krękowski A. Analysis of chosen polymorphisms in FoxP3 gene in children and adolescents with autoimmune thyroid diseases. *Autoimmunity*. 2014;47:395-400.
11. Tan G, Zheng G, Li J, Zhu Y, Liang Z, Li H, Yu H, Wang X. Association of genetic variations in FoxP3 gene with Graves' disease in a Southwest Chinese Han population. *Immun Inflamm Dis*. 2023;11:e1046.



Fulya Yaylacioğlu Tuncay¹,
 Kübra Serbest Ceylanoğlu²,
 Sezen Güntekin Ergün³,
 Berçin Tarlan⁴, Onur Konuk⁴

¹Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

²Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Ulucanlar Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Göz Hastalıkları Kliniği, Ankara, Türkiye

³Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

⁴Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Cite this article as: Yaylacioğlu Tuncay F, Serbest Ceylanoğlu K, Güntekin Ergün S, Tarlan B, Konuk O. Reply to Letter to the Editor Re: How to Estimate Allele Frequencies and Make Statistical Comparisons in Case-Control Studies of Polymorphic X-Linked Loci.

Turk J Ophthalmol. 2024;54:247-250

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Fulya Yaylacioğlu Tuncay, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

E-posta: drfulyatuncay@gmail.com ORCID-ID: orcid.org/0000-0002-2088-3416

Geliş Tarihi/Received: 24.07.2024 Kabul Tarihi/Accepted: 03.08.2024

DOI: 10.4274/tjo.galenos.2024.50430