

Penjujukan Eksom Bagi Penyakit Jarang Jumpa, Mullerian Agenesis dan Agenesis Anotectal anomaly: Kajian Kes

(Whole Exome Sequencing of a Rare Disease, Mullerian Agenesis and Anorectal Anomaly: A Case Report)

Siti Aishah Sulaiman^{1*}, Nor Azian Abdul Murad^{1*}, Yock Ping Chow¹, Muhammad-Redha Abdullah-Zawawi¹, Zam Zureena Mohd Rani¹, Siti Nurmi Nasir¹, Salwati Shuib², Dayang Anita Abdul Aziz³, Hana Azhari³, Sharifah Azween Syed Omar⁴, Zarina Abdul Latiff⁴, Rahman Jamal¹

¹Institut Biologi Molekul Perubatan UKM (UMBI), Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM), Malaysia;

²Jabatan Patologi, ³Jabatan Surgeri, ⁴Jabatan Pediatrik, Fakulti Perubatan, Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM), Jalan Yaacob Latif, 56000, Cheras, Kuala Lumpur, Malaysia.

*Correspondence: sitiaisahsulaiman@ukm.edu.my; nor_azian@ppukm.ukm.edu.my

Abstrak

Agenesis Mullerian atau Sindrom Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH) Jenis II ialah kecacatan kongenital pada saluran Mullerian yang mengakibatkan ketiadaan uterus pada wanita. Etiologi sindrom ini tidak diketahui dan telah dianggap sebagai penyakit genetik sporadik. MRKH bersama dengan anomali anorektal, amat jarang berlaku dan hanya dilaporkan dalam beberapa kes sehingga kini, tanpa sebarang maklumat mengenai analisis genetik. Kajian ini dilakukan untuk menentukan profil mutasi kanak-kanak perempuan yang didiagnosis dengan MRKH dan anomali anorektal dengan fistula rektovagina. Analisis trio-genetik penjujukan keseluruhan eksom (WES) terhadap seorang kanak-kanak perempuan Malaysia berusia 5 tahun yang didiagnosis dengan MRKH dan anomali anorektal dengan fistula rektovagina, dilakukan bersama dengan sampel ibu bapanya yang normal dengan menggunakan kit Ion AmpliSeq™ Exome RDY (Thermo Fisher Scientific). Data dianalisis menggunakan Torrent Suite v.5.0.4 dan dianotasi menggunakan ANNOVAR. Polimorfisme nukleotida tunggal (SNP) dengan kekerapan alel >0.01 dikecualikan dan varian selebihnya ditapis berdasarkan mutasi de novo dan sifat pewarisan autosomal resesif dan digenik autosomal resesif. Gen yang berkaitan kemudiannya dianalisis dengan Analisis pengayaan fungsi dan tapak jalan (g:Profiler) serta interaksi protein-protein (HIPPIE v.2.3, STRING v.11.5, dan GeneMANIA). Sebanyak 36 mutasi telah dikenalpasti, dan dua daripadanya adalah LHX5 (p.P358Q) yang diwarisi daripada ayah dan CFTR (p.R1158X) yang diwarisi daripada ibu. Jumlah mutasi de-novo adalah sebanyak 28 mutasi dalam 28 gen. Kesemua gen-gen ini terlibat dalam 27 proses biologi yang dihubungkan dengan 23 interaksi. Sebanyak dua mutasi diwarisi dan 28 mutasi de-novo dalam 30 gen yang boleh berinteraksi antara satu sama lain dan berkemungkinan menyebabkan sindrom MRKH pada pesakit ini.

Kata kunci: Penyakit jarang jumpa; Mullerian Agenesis dan Anorectal Anomaly; Penjujukan eksom

Abstract

Mullerian agenesis or Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser Syndrome (MRKH) Type-II is a congenital defect in the Mullerian duct that results in the absence of a uterus in women. The aetiology of this syndrome is unknown and has been considered a sporadic genetic disease. MRKH, together with anorectal anomaly, is an extremely rare condition and has only been reported in a few cases without any information on genetic analysis. This study investigated

the mutational profile of a girl diagnosed with MRKH and anorectal anomalies with rectovaginal fistula. The whole exome sequencing (WES) trio-genetic analysis of a 5-year-old Malaysian girl diagnosed with MRKH (having anorectal anomaly with rectovaginal fistula) was performed together with her normal parents, using the Ion AmpliSeq Exome RDY kit (ThermoFisher Scientific, USA). Data were analysed using Torrent Suite v.5.0.4 and annotated using ANNOVAR. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) with an allele frequency >0.01 were excluded, and the remaining variants were filtered based on de novo mutations, autosomal recessive, and autosomal recessive genetic traits. Related genes were analysed by biological pathway analysis (g:Profiler) and protein-protein interaction (HIPPIE v.2.3, STRING v.11.5, dan GeneMANIA). A total of 36 mutations were identified, and two of them, the LHX5 (p.P358Q), inherited from the father, and CFTR (p.R1158X), inherited from the mother. There were 28 de-novo mutations from 28 genes. All genes were involved in 27 biological processes that connected with 23 interactions, and are likely to cause MRKH syndrome in this patient.

Kata kunci: Rare disease; Mullerian Agenesis and Anorectal Anomaly; Exome sequencing

PENGENALAN

Agenesis mullerian atau juga dikenali sebagai sindrom Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH), adalah kecacatan kongenital pada saluran Mullerian. Ia menyebabkan saluran Mullerian tidak dapat berkembang dengan sempurna, mengakibatkan ketiadaan uterus atau rahim pada wanita dengan ciri seks sekunder dan karyotype yang normal (46,XX) (Liszewska-Kapłon et al. 2020). MRKH menjejaskan sekurang-kurangnya 1 daripada 4000 – 5000 wanita dan merupakan salah satu punca utama amenorea primer pada remaja perempuan (Liszewska-Kapłon et al. 2020). Kira-kira dua pertiga daripada pesakit MRKH yang terjejas dikelaskan sebagai Jenis I (terpencil) atau urutan Rokitansky (OMIM 277000) manakala selebihnya dikenali sebagai Jenis II atau Mullerian duct aplasia, Renal agenesis dan anomali Somite toraks-serviks (MURCS) (OMIM 601076) (Chmel et al. 2019). Pesakit MURCS sering menunjukkan kelainan seperti kecacatan buah pinggang atau agenesis buah pinggang (30%), kecacatan rangka (10%–15%), anomali jantung (2%–3%), dan pekak (2%–3%) (Morcel, Camborieux, and Guerrier 2007).

Penyebab genetik MRKH dan MURCS sebahagian besarnya tidak diketahui dan telah lama dianggap sebagai anomali sporadik. Anomali sporadik ini mungkin disebabkan oleh mutasi gen heterozigot de novo (Triantafyllidi et al. 2022). Walaubagaimanapun, terdapat beberapa kes MRKH yang telah dilaporkan berlaku disebabkan pewarisan genetik (Ledig and Wieacker 2018). Beberapa calon gen telah dicadangkan berdasarkan kajian lepas yang berkait dengan sindrom MRKH. Ini termasuklah gen isyarat WNT (WNT4, WNT5A, WNT7A, WNT9B), gen HOXA (HOXA7, HOXA10, HOXA13), HNF1B, LHX1, TBX6, RBM8A, CFTR1, GALT, PBX1, AMHR, RARG, RXRA, CTNNB1, PAX2, LAMC1, DLGH1,

DACT1 atau SHOX (Triantafyllidi et al. 2022; Ledig and Wieacker 2018; Layman 2014). Walau bagaimanapun, kebanyakan mutasi ini dikaitkan secara tidak langsung dan dilaporkan hanya pada satu atau dua kes sahaja (Triantafyllidi et al. 2022; Ledig and Wieacker 2018; Layman 2014). Ini mendorong kepada keperluan untuk kajian genetik lanjutan dilakukan ke atas saiz sampel MRKH yang lebih besar dan berbeza populasi bagi memahami patogenesis penyakit MRKH dengan lebih terperinci.

Pesakit sindrom MRKH atau MURCS boleh juga didapati mempunyai anomali daripada penyakit jarang jumpa yang lain seperti penyakit anomali kongenital yang meliputi anomali vertebral, atresia anal, kecacatan jantung, fistula trakeoesofagus, kecacatan buah pinggang, dan anomali pada anggota badan, yang juga dikenali sebagai VACTERL (OMIM 192350). MRKH dengan anomali anorektal adalah merupakan kes terpencil yang sangat jarang berlaku dan telah dilaporkan memiliki beberapa kes sahaja sebelum ini. Kajian ke atas penyakit MRKH bersama anomali anorektal juga masih belum dikaji secara terperinci pada peringkat genetik di Malaysia (Triantafyllidi et al. 2022; Williams et al. 2017; Chen et al. 2015; Backhouse et al. 2019; Herlin et al. 2019; Thomson et al. 2022; Sulaiman et al. 2018). Oleh itu, analisis trio-genetik bersama sampel ibubapa seorang gadis Malaysia yang didiagnosis dengan MRKH dan anomali anorektal dengan fistula rektovaginal telah dijalankan di dalam kajian ini menggunakan penjujukan keseluruhan eksom (WES) dalam mengenalpasti mutasi yang menjadi punca kepada penyakit jarang jumpa tersebut.

KAEDAH KAJIAN

Subjek dan Penemuan Klinikal

Seorang bayi perempuan Melayu telah dilahirkan cukup bulan melalui

pembedahan dengan berat 1.9 kg. Sebelum pembedahan, air ketuban ibu didapati berwarna mekonium dan bayi telah menunjukkan petanda simptom bayi lemas (fetal distress). Bayi perempuan ini adalah anak ketiga daripada ibubapa yang sihat dan kedua-dua kakaknya juga merupakan individu yang sihat. Ibu dan bapanya masing-masing berumur 43 dan 38 tahun; dan tiada pertalian darah. Namun begitu, penyakit jarang jumpa, VACTERL telah dikesan pada bayi ini pada peringkat awal semasa dalam kandungan ibu. Antara beberapa ciri anomali yang dikesan adalah (i) hemivertebra berbilang di kawasan torako-lumbar, (ii) rusuk bercantum secara dua hala, (iii) skoliosis kongenital tanpa kelainan saraf tunjang, (iii) buah pinggang ladam, (iv) hidronefrosis dua hala dan hidroureter, (v) pundi kencing neurogenik dengan fungsi buah pinggang yang stabil, (vi) hipoplasia tulang scaphoid dua hala dan (vii) anomali anorektal dengan fistula rektovagina. Selepas 15 hari dilahirkan, bayi ini juga didiagnos mempunyai agenesis Mullerian. Rawatan anorektoplasti sagittal posterior elektif (PSARP) pertama telah dilakukan pada umur 23 hari, namun komplikasi luka pada kawasan pembedahan telah berlaku dan fistula rektovaginal kembali terbentuk setahun selepas itu. Berikutan kejadian tersebut, rawatan PSARP kedua dan pengikatan fistula telah dilakukan dan ketiadaan rahim telah disahkan melalui kaedah laparoscopi pada masa yang sama. Rawatan susulan bagi anomali VACTERL yang lain telah diberikan pada tahun-tahun berikutnya dan keadaan beliau telah dipantau secara berterusan. Semasa kajian genetik ini dilakukan, pesakit berumur lima tahun dan didapati telah mencapai perkembangan tumbesaran yang baik dengan tingkah laku yang sangat aktif dan pergaulan yang normal.

Analisis Sitogenetik

Darah periferi telah diambil daripada pesakit untuk penghasilan limfosit

mengikut protokol piawai. Kromosom berjalur Giemsa daripada 20 metafasa telah dilakukan. Penyiataan lanjut menggunakan teknik penghibridan in situ pendarfluor (FISH) telah dilakukan dengan menggunakan prob untuk 22q11.2 (N25 dan TUPLE1, kawasan kritikal sindrom DiGeorge/velocardiofacial) (Vysis Abbott Molecular Inc., Amerika Syarikat) dan juga kromosom 13 dan 18.

Isolasi DNA serta Penyediaan Sampel Bagi Penjujukan Genom

Berikutan kaunseling genetik, ibu bapa telah memberikan persetujuan bertulis untuk penjujukan eksom dilakukan. Pensampelan darah periferi yang diambil daripada pesakit dan kedua ibu bapanya telah digunakan bagi mengekstrak DNA menggunakan kaedah konvensional (teknik pengekstrakan garam). Kualiti dan ketulenan DNA telah dinilai menggunakan elektroforesis gel agaros dan Spektrofotometer NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Amerika Syarikat). Kepekatan DNA kemudiannya diukur menggunakan Qubit dsDNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Amerika Syarikat).

Penyediaan Perpustakaan DNA dan Penjujukan Eksom (WES)

Perpustakaan DNA disediakan dengan menggunakan Kit Ion AmpliSeq™ Exome RDY (Thermo Fisher Scientific, Amerika Syarikat) yang mensasarkan kesemua kawasan eksom dalam genom manusia. Perpustakaan DNA kemudiannya disediakan untuk penjujukan dalam cip Ion PI™ V3 (Thermo Fisher Scientific, Amerika Syarikat) dengan menggunakan sistem Ion Chef™ (Thermo Fisher Scientific, Amerika Syarikat), berdasarkan saranan pengeluar. Cip yang disediakan dengan perpustakaan DNA dimasukkan ke dalam sistem Ion Proton™ (Thermo Fisher Scientific, Amerika Syarikat) dan penjujukan DNA dilaksanakan seperti yang

telah disyorkan oleh pengeluar. Data mentah (bacaan jujukan DNA) dihantar secara automatik ke server Ion Torrent™ (Thermo Fisher Scientific, Amerika Syarikat) untuk analisis seterusnya.

Analisis Bioinformatik

Pemetaan bacaan dan panggilan varian telah dilakukan dengan menggunakan perisian Ion TorrentSuite™ v5.0.4 (Thermo Fisher Scientific, USA). Bacaan jujukan DNA telah diselaraskan dengan genom rujukan manusia hg19 dan diikuti dengan panggilan varian menggunakan TorrentSuite™ Variant Caller v5.0.13. Seterusnya, varian dengan kualiti polimorfisme nukleotida tunggal (SNP) ≤ 30 telah ditapis menggunakan SnpSift (Cingolani et al. 2012) dan seterusnya menggunakan perisian ANNOVAR (Wang, Li, and Hakonarson 2010) bagi menganotasi setiap varian yang telah dikenalpasti. Varian tidak sinonim yang dikenalpasti pada kawasan pengekodan (eksonik, penyambungan) dengan kedalaman bacaan $>5X$ telah dikekalkan bagi analisis yang selanjutnya. Untuk mengenal pasti mutasi yang menyebabkan penyakit jarang jumpa, polimorfisma dengan frekuensi alel > 0.01 yang dilaporkan dalam (i) Projek 1000 Genom, (ii) NHLBI Exome Sequencing Project (ESP) Pelayan Varian Eksom, (iii) Exome Aggregation Consortium (ExAC), (iv) Genomik Lengkap (cg69) dan (v) kekerapan populasi maksimum telah ditapis keluar. Selepas itu, mutasi penyebab penyakit telah dikenalpasti berdasarkan sifat pewarisan jenis *de novo*, resesif autosomal, resesif berkaitan kromosom X dan pewarisan digenik. Seterusnya, varian yang memenuhi kriteria di atas telah diperiksa secara manual menggunakan Integrative Genomics Viewer (IGV) bagi menapis varian positif palsu (false positive) yang dikenalpasti (Thorvaldsdóttir, Robinson, and Mesirov 2013; Robinson et al. 2017). Bagi mengenalpasti impak varian ke atas fungsi biologi protein, beberapa

perisian telah digunakan seperti (i) Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT) (Kumar, Henikoff, and Ng 2009), (ii) Polymorphism Phenotyping v2 (PolyPhen-2) (Adzhubei, Jordan, and Sunyaev 2013), (iii) Mutation Taster (Schwarz et al. 2010), (iv) Functional Analysis through Hidden Markov Models (FATHMM) (Shihab et al. 2013), (v) Combined Annotation Dependent Depletion (CADD) (Kircher et al. 2014), (vi) Protein Variation Effect Analyzer (PROVEAN) (Choi et al. 2012), dan (vii) Deleterious Annotation of Genetic Variants using Neural Network (DANN) (Quang, Chen, and Xie 2015). Kesemua calon mutasi yang diklasifikasikan sebagai merosak (damaging) kemudiannya telah disimpan ke dalam inventori bagi carian fungsi varian melalui pembuktian kajian terdahulu.

Validasi Penemuan WES

Calon mutasi yang diwarisi telah disahkan dengan teknik penjujukan DNA Sanger. Secara ringkasnya, 100 ng sampel DNA dicampurkan dengan pencetus bagi mutasi tertentu (Jadual 1), dan campuran Master HotStarTaq (Qiagen, Jerman) untuk amplifikasi kaedah tindak balas berantai polimerase (PCR). Produk PCR kemudiannya ditulen dengan menggunakan kit Penulenan PCR QIAquick (Qiagen, Jerman) mengikut saranan pembekal sebelum digunakan untuk penjujukan Sanger dengan menggunakan kit BigDye V3.1 (Applied Biosystem, USA) melalui alat penjujukan 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystem, USA). Turutan DNA dianalisis dengan menggunakan perisian Sequence Scanner v2.0 software (Applied Biosystem, USA) dan disahkan dengan data genom manusia di NCBI-blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Visualisasi kewujudan mutasi nukleotida dilihat dengan menggunakan perisian Chromas v.2.6.6 (Technelysium Pty. Ltd., Australia).

Jadual 1 Turutan Pencetus yang digunakan.

Gen	Pencetus	Turutan DNA Pencetus 5' - 3'	Saiz produk (bp)
LH X5	pencetus ke hadapan	CGGCTTCGTTGA GCTCGGGG	238
	pencetus ke belakang	CGGCTTCGTTGA GCTCGGGG	
CF TR	pencetus ke hadapan	CCCACAAATA ACCAAGTGACA	299
	pencetus ke belakang	CTTTGACAGTCA TTTGGCCCC	

Analisis Pengayaan Tapak Jalan dan Ontologi Gen

Analisis pengayaan fungsi dan tapak jalan telah dijalankan bagi mengenal pasti kelas gen perwakilan berlebihan daripada set gen termutasi yang berkemungkinan memiliki kaitan dengan fenotip penyakit. Di dalam kajian ini, g:Profiler (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost>) (Raudvere et al. 2019) telah digunakan bagi analisis pengayaan menggunakan set data anotasi dari BioMart (Smedley et al. 2009) bagi fungsi molekul (MF), komponen sel (CC), proses biologi (BP) dan tapak jalan Reactome (Haw et al. 2011). Manakala, maklumat tapak jalan lain yang digunakan adalah Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (Kanehisa et al. 2016). Parameter yang digunakan bagi analisis pengayaan adalah seperti berikut: (i) Homo sapiens (manusia) telah dipilih sebagai organisma rujukan, (ii) BP, MF and CC telah dipilih bagi GO dan (iii) pangkalan data tapak jalan yang digunakan pula ialah KEGG dan Reactome (REAC). Nilai ambang signifikan telah ditetapkan kepada 0.05 dengan menggunakan kaedah Benjamini-Hochberg (BH).

Analisis Pengayaan Reactome (REAC)

Analisis pengayaan tapak jalan turut dijalankan menggunakan REAC v.83 (<https://reactome.org>) menggunakan pengecam simbol gen bagi pemetaan (Jassal et al. 2020). Parameter yang

digunakan bagi analisis pengayaan REAC adalah seperti berikut. Homo sapiens (manusia) telah dipilih sebagai organisma pilihan. Kaedah analisis perwakilan berlebihan digunakan untuk analisis pengayaan ini yang mana ujian statistik (taburan hipergeometrik) menentukan samada tapak jalan REAC diwakili secara berlebihan dalam data yang diserahkan. Kaedah BH telah digunakan bagi memperbetulkan kadar penemuan palsu tapak jalan.

Analisis Interaksi Protein-Protein (IPP)

Interaksi protein-protein telah diperolehi daripada tiga pangkalan data utama iaitu HIPPIE v.2.3 (<http://cbdm-01.zdv.uni-mainz.de/~mschaefer/hippie/>) (Alanis-Lobato, Andrade-Navarro, and Schaefer 2017), STRING v.11.5 (<https://string-db.org>) (Szklarczyk et al. 2021) dan GeneMANIA (<http://genemania.org>) (Franz et al. 2018). HIPPIE adalah merupakan pangkalan data komprehensif yang telah menggabungkan IPP daripada sumber yang pelbagai. Skor keyakinan bagi setiap interaksi juga turut disediakan yang merujuk kepada nilai antara 0 sehingga 1. Skor keyakinan menggambarkan kebolehpercayaan interaksi berdasarkan bilangan dan kualiti teknik eksperimen yang digunakan dari setiap sumber serta yang dilaporkan dari kajian terdahulu. Nilai pemotongan 0.73 telah dipilih berdasarkan kurator HIPPIE yang merujuk nilai tersebut sebagai interaksi yang paling boleh dipercayai dan memiliki pembuktian interaksi yang tinggi. Bagi STRING, interaksi antara protein telah diekstrak menggunakan palam StringApp dengan nilai potongan keyakinan sebanyak 0.4 (Doncheva et al. 2019). Manakala maklumat interaksi daripada GeneMANIA pula diperolehi dengan parameter pencarian 20 gen berkaitan teratas menggunakan pemberat automatik. Ketiga-tiga maklumat IPP kemudiannya digabungkan dan divisualisasikan menggunakan perisian Cytoscape v.3.9.1 (Shannon et al. 2003).

HASIL KAJIAN

Analisis Sitogenetik

Kanak-kanak ini mempunyai karyotip perempuan normal melalui analisa kromosom ke atas 15 serakan metafasa (pewarnaan Giemsa) yang diperolehi dari kultur limfosit darah periferi.

Penjujukan Eksom (WES) dan Variasi Genetik Yang Ditemui

Purata 31 juta bacaan jujukan DNA telah dipetakan ke pangkalan genom hg19 untuk semua sampel, dengan purata 85.43% asas diliputi pada liputan > 20X (Jadual 2). Purata liputan kedalaman terendah ialah 60.16X dan yang tertinggi ialah 111X (Jadual 2). Purata keseragaman merentas sampel ialah 88.65% (Jadual 2).

Untuk mengenal pasti pewarisan varian atau mutasi yang dikaitkan dengan penyakit MRKH dengan anomali anorektal, senarai mutasi telah ditapis berdasarkan ciri resesif autosomal dan resesif berkaitan kromosom X homozigot. Namun begitu, tiada sebarang calon mutasi atau gen melalui mod warisan resesif autosomal dan sifat resesif berkaitan kromosom X homozigot telah dikenalpasti pada pesakit (Jadual 3). Oleh itu, analisis lanjut telah dilakukan bagi mengenalpasti ciri-ciri warisan heterozigot. Pesakit mempunyai enam mutasi heterozigot yang diwarisi secara digenik resesif autosomal, iaitu tiga diwarisi daripada bapa dan tiga lagi adalah daripada ibu, yang menjejaskan tiga gen, iaitu Reseptor Berkaitan Reseptor Insulin (INSRR), Reelin (RELN) dan Pengisihan Protein Vakuolar 13 Homolog B (VPS13B)). Walau bagaimanapun, tiada satu pun daripada gen-gen ini dikaitkan dengan VACTERL atau MRKH/MURCS. Satu mutasi heterozigot gen yang mungkin berkaitan dengan MRKH ialah gen Pengatur Konduktans Transmembran Fibrosis Kistik (CFTR) (Jadual 3). Pesakit mewarisi mutasi heterozigot ini daripada

ibunya (CFTR: ENST00000426809:c.3382 C>T: p.R1128X) secara resesif autosomal. Selain itu, pesakit juga mewarisi mutasi heterozigot (LHX5: ENST00000261731:c.1073 C>A: p.P358Q) pada gen LIM Homeobox Protein 5 (LHX5), yang merupakan gen paralog kepada calon MURCS gen yang lain, LHX1 (Rajah 1). Mutasi salah erti ini telah diramalkan sebagai memudaratkan oleh pelbagai perisian ramalan.

Sebanyak 28 mutasi de novo telah dikenalpasti dalam pesakit (Jadual 3). Kebanyakan mutasi gen de novo yang dikenalpasti mempengaruhi otot dan vertebrata (DMD, MSN), sitoskeleton (KIF13B, PTCHD2), isyarat neuron, dan proses pembezaan (PTCHD2, SEMA4F, PCDHA4, PCDHB8).

Analisis Pengayaan GO dan Tapak Jalan dari g:Profiler

Sebilangan besar terma telah berjaya diperkaya oleh g:Profiler dalam pangkalan data GO terutamanya proses biologi. Analisis perwakilan berlebihan GO telah menunjukkan penglibatan penting 28 gen yang termutasi de novo di dalam 27 proses biologi (Rajah 2). Sebanyak 16 gen telah didapati hadir secara signifikan di dalam proses organisma multisel, diikuti dengan proses pembangunan iaitu 15 gen, 14 gen di dalam pembangunan struktur anatomikal dan 13 gen telah diperkaya di dalam proses pembangunan sel dan pembangunan organisma multisel. Manakala proses biologi seperti proses pembangunan sel dan pembezaan sel pula mengandungi 12 gen dan diikuti morfogenesis struktur anatomi dan pembangunan sel iaitu sebanyak sepuluh gen. Tujuh gen iaitu Distrofin (DMD), Induser Terkawal Protein G bagi Pertumbuhan Neutrit 1 (GPRIN1), Ligase Ubikuitin-Protein E3 Barangkali (HERC1), Ahli Famili Kinesin 13B (KIF13B), Miosin 16 (MYO16), Semaforin 4F (SEMA4F) dan Faktor Pertukaran Nukleotida Trio Rho Guanina (TRIO) telah didapati diperkaya di

Jadual 2 Ringkasan keseluruhan parameter penjujukan eksom untuk pesakit dan ibu bapanya.

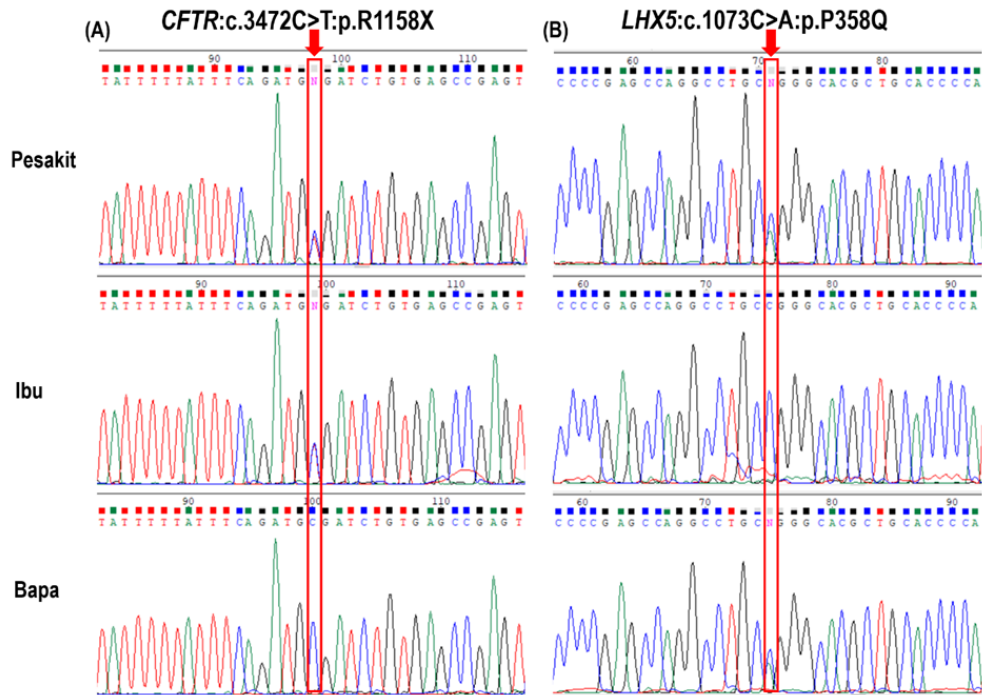
Parameter	Pesakit	Ayah	Ibu
<i>Mapped reads</i> / bacaan dipetakan	23,471,233	31,251,657	39,012,488
<i>On-target (%)</i> / Sasaran tepat	96.08%	95.40%	95.82%
<i>Mean depth coverage</i> / Purata liputan kedalaman	60.16X	86.99X	111X
<i>20X coverage (%)</i> / Liputan 20X (%)	82.28	84.72	89.28
<i>Uniformity (%)</i> / Keseragaman	91.08%	87.10	87.78
Jumlah variasi	41,500	52,365	53,297
Jumlah variasi dengan skor kualiti ≥ 30	31,035	50,405	51,630

Jadual 3 Variasi genetik yang diwarisi secara Digenik- Autosomal Resesif, Resesif Autosomal dan juga *De-Novo*.

Parameter	Gen	Jenis	Pesakit	Ayah	Ibu
• <i>Di-genik Resesif Autosomal</i>					
ENST00000368195:c.2467 G > A:p.A823T	<i>INSRR</i>	Het	CT	CC	CT
ENST00000368195:c.284 G > A:p.R95H	<i>INSRR</i>	Het	CT	CT	CC
ENST00000428762:c.10093 G > A:p.V3365I	<i>RELN</i>	Het	CT	CC	CT
ENST00000428762:c.2189 G > A:p.R730H	<i>RELN</i>	Het	CT	CT	CC
ENST00000358544:c.365 C > T:p.P122L	<i>VPS13B</i>	Het	CT	CC	CT
ENST00000358544:c.7162 A > C:p.K2388Q	<i>VPS13B</i>	Het	AC	AC	AA
• <i>Resesif Autosomal</i>					
ENST00000003084:c.3472 C > T:p.R1158X	<i>CFTR</i>	Het	CT	CC	CT

ENST00000261731:c.1073 C > A:p.P358Q	<i>LHX5</i>	Het	GT	GT	GG
• <i>Mutasi de novo</i>					
ENST00000284984:c.1500_1501TA	<i>ADAMTS1</i>	Homo	AA_HOM	AT	AT
ENST00000336600:c.298 A > G:p.R100G	<i>C6orf223</i>	Het	AG	AA	AA
ENST00000398000:c.A950G:p.D317G	<i>CXorf36</i>	Het	TC	CC	TT
ENST00000378677:c.2084 C > G:p.A695G	<i>DMD</i>	Het	GC	CC	GG
ENST00000298738:c.415 T > C:p.Y139H	<i>ERICH6B</i>	Homo	GG	AG	AG
ENST00000543111:c.3544 C > T:p.P1182S	<i>FAM186A</i>	Het	CT	CC	CC
ENST00000371325:c.127 C > T:p.R43W	<i>FAM209B</i>	Het	CT	CC	CC
ENST00000270879:c.C443 C > T:p.S148F	<i>FCN3</i>	Het	CT	CC	CC
ENST00000303991:c.698 A > T:p.E233V	<i>GPRIN1</i>	Het	TA	AA	TT
ENST00000443617:c.13111 T > C:p.S4371P	<i>HERC1</i>	Het	AG	AA	AA
ENST00000543163:c.788 A > G:p.K263R	<i>HPD</i>	Homo	CC	TT	TT
ENST00000356578:c.313 C > A:p.Q105K	<i>INS-IGF2</i>	Het	GT	GG	GG
ENST00000404075:c.583 A > G:p.N195D	<i>KIF13B</i>	Het	TC	TT	TT
ENST00000361470:c.1082 G > C:p.G361A	<i>MAGEE1</i>	Homo	CC	GC	GC
ENST00000358812:c.180 T > A:p.D60E	<i>MANEA</i>	Het	TA	TT	TT
ENST00000592416:c.224 G > T:p.G75V	<i>MEX3C</i>	Het	CA	CC	CC
ENST00000257776:c.112 C > A:p.L38M	<i>MRAP2</i>	Het	CA	CC	CC

ENST00000360270:c.113 G > A:p.G38D	<i>MSN</i>	Het	GA	GG	GG
ENST00000375994:c.902 C > T:p.T301I	<i>MYLK2</i>	Het	CT	CC	CC
ENST00000356711:c.G3299 G > A:p.R1100H	<i>MYO16</i>	Homo	AA	GA	GA
ENST00000530339:c.207_208AA	<i>PCDHA4</i>	Homo	AA	GG/AA	GG/AA
ENST00000239444:c.699_700CC	<i>PCDHB8</i>	Homo	CC	TG/CC	TG/CC
ENST00000294484:c.2942 G> A:p.R981H	<i>PTCHD2</i>	Homo	AA	GG	GA
ENST00000339773:c.52 T > C:p.S18P	<i>SEMA4F</i>	Het	TC	TT	TT
ENST00000222345:c.3262 G > A:p.A1088T	<i>SIPA1L3</i>	Het	GA	GG	GG
ENST00000537187:c.8572 G > A:p.D2858N	<i>TRIO</i>	Homo	GG	GA	GA
ENST00000532200:c.546 G > C:p.Q182H	<i>ZFPL1</i>	Het	GC	GG	GG
ENST00000478296:c.2450 A > T:p.E817V	<i>ZNF717</i>	Het	TA	TT	TT



Rajah 1 Visualisasi kedua-dua calon mutasi yang diwarisi pada gen A) *CFTR*, dan B) *LHX5*.



Rajah 2 Hasil keseluruhan analisis pengayaan GO dan tapak jalan bagi 28 gen yang memiliki mutasi *de novo* menggunakan g:Profiler.

dalam organisasi projeksi sel terikat membran plasma, organisasi projeksi sel, serta lima proses biologi berkaitan neuron seperti pembangunan projeksi neuron, pembangunan neuron, penjanaan neuron, pembezaan neuron dan neurogenesis. Beberapa proses morfogenesis berkaitan projeksi sel dan neuron, bahagian sel, unjuran sel terikat membran plasma dan komponen sel turut diwakili secara berlebihan oleh gen DMD, KIF13B, MYO16, SEMA4F dan TRIO. Antara proses biologi signifikan lain yang dikenalpasti adalah pembangunan sel epitelial, pembentukan polariti sel epitelium, homeostasis tenaga dan organisasi struktur saraf olfaktori. Kami merumuskan bahawa kebanyakan fungsi 28 gen termutasi de novo ini tertumpu kepada proses pembangunan, pembezaan dan morfogenesis sel.

Analisis Pengayaan Tapak Jalan REAC

Melalui analisis pengayaan Reactome, sejumlah besar tapak jalan telah berjaya diperkaya. Sebanyak 11 tapak jalan telah diperkaya secara signifikan yang terdiri daripada enam kategori utama iaitu pengekspresan gen (transkripsi), biologi perkembangan, sistem keimunan, metabolisme, metabolisme protein, dan transduksi isyarat (Jadual 4). Daripada 28 gen, hanya enam gen telah didapati terlibat di dalam enam kategori utama tapak jalan Reactome. Dua gen iaitu Fikolin 3 (FCN3) dan Moesin (MSN) telah didapati terlibat di dalam tapak jalan sistem keimunan yang berbeza. FCN3 berfungsi sebagai gen tapak jalan fikolin yang mengikat struktur karbohidrat berulang pada permukaan sel sasaran dan tapak jalan lektin pengaktifan pelengkap, manakala MSN pula terlibat di dalam tapak jalan interleukin-12 dan pengekspresan gen dan protein oleh Transduser Isyarat Janus kinase dan Pengaktif Transkripsi (JAK-STAT) disebabkan rangsangan interleukin-12. Hasil analisis pengayaan tapak jalan turut mendedahkan penglibatan penting GPRIN1

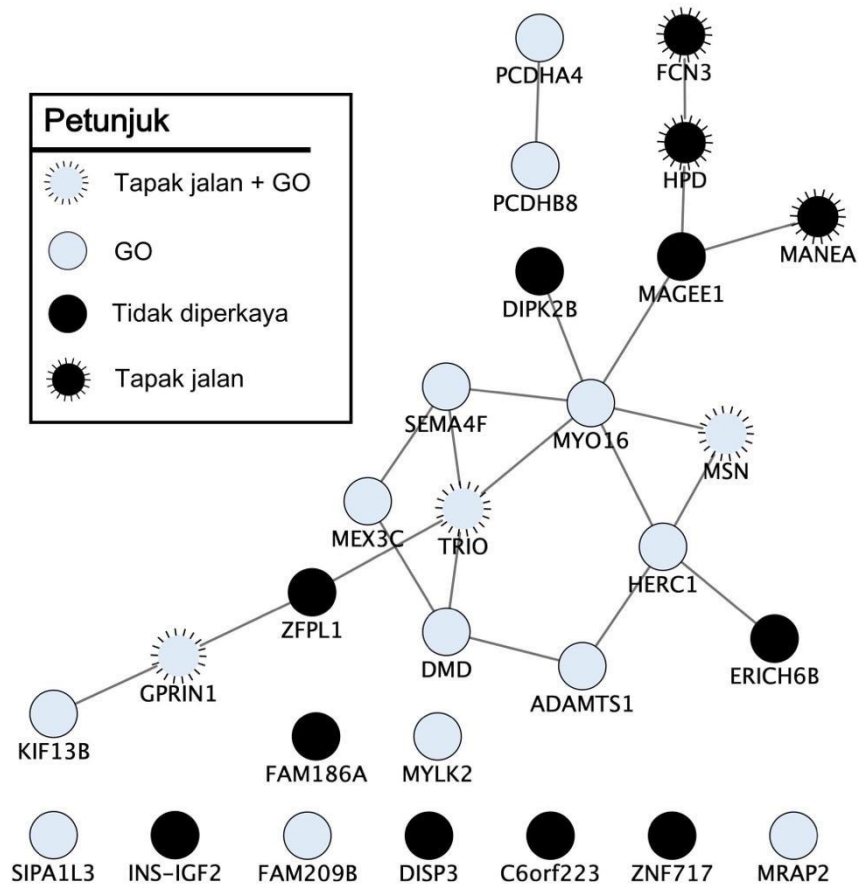
di dalam tapak jalan kawal atur pentranskripsi protein dari pengikat metil-CpG 2 (MECP2). Selain itu, tapak jalan pengisyaratan tarikan antara DCC dan kitaran GTPase Kitaran Pembahagian Sel 42 (CDC42) turut diwakili secara berlebihan melalui tindak balas daripada TRIO. Antara tapak jalan lain yang turut diwakili secara berlebihan adalah tapak jalan katabolisme tirosina oleh Dioksigenase 4-Hidroksifenilpiruvate (HPD) serta pemotongan dan pemanjangan N-glikan dalam cis-golgi oleh Mannosidase Endo-Alfa (MANEA). Hasil daripada analisis pengayaan ini mencadangkan bahawa beberapa tapak jalan penting terutamanya sistem keimunan, berkemungkinan terjejas disebabkan oleh kehadiran mutasi de novo yang dilaporkan.

Analisis Jaringan Interaksi Protein-Protein

Bagi meneroka IPP, analisis berasaskan jaringan telah dilakukan dengan menggunakan 28 gen termutasi de novo sebagai pertanyaan bagi mendapatkan semula data IPP daripada tiga pangkalan data jaringan interaksi (GeneMANIA, HIPPIE dan STRING). Rajah 3 menunjukkan 28 gen termutasi de novo yang dihubungkan oleh 23 interaksi. Jaringan IPP ini telah dibina daripada tiga jaringan IPP yang menghasilkan 26 nod dan tiga interaksi daripada HIPPIE; 28 nod dan satu daripada STRING dan 28 nod dan 21 interaksi daripada GeneMANIA. Sebanyak sembilan gen telah didapati tidak berinteraksi dengan mana-mana gen iaitu Famili dengan Persamaan Jujukan 209 Ahli B (FAM209B), Isyarat-Tercetus Berkaitan-Proliferasi 1 Seperti 3 (SIPA1L3), Faktor Pertumbuhan Seperti Insulin 2 (INS-IGF2), Kinase Berantai Ringan Miosin 2 (MYLK2), Famili dengan Persamaan Jujukan 186 Ahli A (FAM186A), Protein Aksesori Reseptor Melanokortin 2 (MRAP2), Protein Jarian Zinkum 717 (ZNF717), Protein Rekombinan

Jadual 4 Senarai tapak jalan yang diperkaya secara signifikan oleh REAC

Kategori Tapak Jalan	Nama Tapak Jalan	Nilai-P	Nama Gen
Sistem keimunan	Fikolin yang mengikat struktur karbohidrat berulang pada permukaan sel sasaran	0.04115163	<i>FCN3</i>
Sistem keimunan	Tapak jalan lektin pengaktifan pelengkap	0.03711146	<i>FCN3</i>
Pengekspresan gen (transkripsi)	MECP2 mengawal reseptor dan saluran neuron	0.01034497	<i>GPRIN1</i>
Pengekspresan gen (transkripsi)	Kawal atur pentranskripsi oleh MECP2	0.01350301	<i>GPRIN1</i>
Metabolisma	Katabolisme tirosina	0.01736393	<i>HPD</i>
Metabolisma protein	Pemotongan dan pemanjangan N-glikan dalam <i>cis</i> -golgi	0.0391336	<i>MANEA</i>
Sistem keimunan	Pengekspresan gen dan protein oleh isyarat JAK-STAT selepas rangsangan interleukin-12	0.04390783	<i>MSN</i>
Sistem keimunan	Pengisyaratan interleukin-12	0.04115163	<i>MSN</i>
Sistem keimunan	Pengisyaratan famili interleukin-12	0.03711146	<i>MSN</i>
Biologi pembangunan	Pengisyaratan tarikan antara DCC	0.01034497	<i>TRIO</i>
Transduksi pengisyaratan	Kitaran GTPase CDC42	0.01350301	<i>TRIO</i>



Rajah 3 Jaringan IPP bagi 28 gen termutasi *de novo* yang diintegrasikan daripada pangkalan data STRING, HIPPIE dan GeneMANIA. Maklumat perwakilan berlebihan tapak jalan dan GO turut dipetakan ke atas nod gen yang terlibat.

Kromosom Manusia 6 Rangka Bacaan Terbuka 223 (C6orf223) dan Ahli Famili Pengangkut yang Dihantar RND 3 (DISP3). Ketiadaan maklumat IPP bagi kesembilan gen adalah berkemungkinan disebabkan oleh kekurangan data IPP yang menghubungkan gen pertanyaan dengan gen lain dalam pangkalan data. Sebanyak 32% gen termutasi de novo telah didapati tidak diperkaya di dalam mana-mana tapak jalan atau GO. Namun begitu, beberapa gen turut dilaporkan berinteraksi dengan beberapa gen tapak jalan dan proses biologi penting, seperti interaksi antara Antigen Melanoma Famili E 1 (MAGEE1) dengan HPD (katabolisme tirosina) dan MANEA (pemotongan dan pemanjangan N-glikan dalam cis-golgi), Protein Mencapai Domain Kinase 2B (DIPK2B) dengan MYO16 (gen morfogenesis dan pembangunan berkaitan neuron), Protein Bak Jarian Zink 1 (ZFPL1) dengan gen pembangunan berkaitan neuron dan transduksi pengisyaratan iaitu TRIO dan GPRIN1, dan Protein 6B Kaya Glutamat (ERIC6B) dengan gen organisasi projeksi sel serta proses pembangunan neuron iaitu HERC1. Kami postulat bahawa keempat-empat gen termutasi de novo tersebut berkemungkinan untuk turut terlibat di dalam tapak jalan dan GO yang dinyatakan berdasarkan interaksi bersama dengan gen yang diperkaya. Namun begitu, pengesahsahihan secara eksperimen amat diperlukan bagi mengesahkan peranan mereka dengan lebih lanjut di dalam tapak jalan dan proses berkaitan dengan Agenesis Mullerian pada masa hadapan.

PERBINCANGAN

Agenesis Mullerian merupakan penyakit jarang jumpa yang juga dikenali sebagai Mullerian aplasia, sindrom Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH) serta agenesis vagina atau faraj. Penyakit ini boleh berlaku dalam satu setiap 4,500 – 5,000 wanita (Liszewska-Kapłon et al. 2020; Chmel et al. 2019). Ianya adalah disebabkan oleh ketidaknormalan

embrionik pada salur Mullerian menyebabkan agenesis atau atresia pada faraj, rahim atau pada kedua-duanya. Pesakit juga berkemungkinan tidak mempunyai rahim, serviks dan/atau faraj. Sebanyak 10% daripada kes wanita yang tidak pernah mengalami haid (Primary amenorrhoea) adalah disebabkan oleh agenesis Mullerian (Liszewska-Kapłon et al. 2020; Chmel et al. 2019).

Berdasarkan keputusan penjujukan keseluruhan eksom, penyakit agenesis Mullerian yang dihadapi pesakit mungkin disebabkan oleh mutasi de-novo yang berlaku pada 28 gen. Ini kerana ibu pesakit adalah seorang wanita yang normal, jadi penyebab penyakit disebabkan pewarisan secara di-genik autosomal resesif mahupun autosomal resesif adalah mustahil sama sekali. Ini bertepatan dengan kebanyakan kes agenesis Mullerian adalah sporadic (Triantafyllidi et al. 2022), walaupun terdapat bukti yang menyatakan terdapat kes agenesis Mullerian yang diwarisi pada sesetengah pesakit (Ledig and Wieacker 2018). Tambahan pula, faktor utama penyakit agenesis Mullerian ini masih belum diketahui. Disamping itu, agenesis Mullerian mungkin juga berlaku disebabkan faktor pewarisan poligenik pelbagai sebab (polygenic multifactorial inheritance) (Ledig et al. 2011; Ledig and Wieacker 2018). Pewarisan jenis ini adalah dicadangkan kerana setiap satu gen ini mempunyai kesan yang sangat minima kepada pesakit, namun boleh berinteraksi antara satu sama lain untuk menghasilkan kesan terhadap perkembangan penyakit. Terutamanya, apabila gen ini bermutasi atau terlibat dalam kromosom abnormaliti seperti duplikasi dan delesi. Sehingga kini, tujuh delesi dan satu duplikasi telah dikenalpasti pada lapan pesakit agenesis Mullerian. Ini termasuklah delesi pada kromosom 1 (1q21.1), 4 (4q34-qter), 8 (8p23.1), 10 (10p14-15), 16 (16p11.2), 17 (17q12) and 22 (22q11.21) dan duplikasi pada kromosom X (Xpter-p22.32) pada gen berikut: HNF1B (dahulunya dikenali

sebagai TCF2), LHX1, TBX6, ITIH5 dan SHOX (Ledig and Wieacker 2018; Triantafyllidi et al. 2022). Walaubagaimanapun, kajian lanjut yang menghubungkan gen ini dengan ageneses Mullerian masih diperlukan kerana sampel kajian terdahulu ini adalah sangat kecil.

Selain itu, mutasi pada gen LHX5 daripada ayah dan mutasi CFTR daripada ibu juga berkemungkinan boleh menyebabkan penyakit ageneses Mullerian. Gen LHX5 mengkodkan famili protein yang membawa domain LIM, iaitu domain pengikat zink yang kaya dengan sistein yang unik. Protein ini berfungsi sebagai pengatur transkrip yang terlibat dalam mengawal proses pembezaan dan pembentukan otak depan (Zhao et al. 2000). Mutasi novel gen LHX1 ditemui pada wanita UK yang menghadapi sindrom MRKH (Ledig et al. 2012) dan kedua-dua protein LHX1 dan LHX5 diperlukan untuk mengekalkan ekspresi gen PAX2 semasa proses perkembangan janin (Pillai et al. 2007). Gangguan isyarat PAX, NOTCH dan Hedgehog (Triantafyllidi et al. 2022), mungkin boleh menyebabkan MRKH dan anomali anorektal yang jarang berlaku ini. Ledig dan rakan-rakan melakukan penjujukan DNA keatas 118 pesakit dewasa MRKH dan mendapati bahawa, mutasi anjak heterozigot pada gen LHX1 (family yang sama dengan LHX5) adalah calon gen yang boleh menyebabkan MRKH (Ledig et al. 2012). Mutasi ini menyebabkan proses pembentukan kodon amino asid terhenti pada kedudukan 33 dan telah dikenalpasti pada pesakit MRKH jenis II dengan ageneses ginjal unilateral. Malah, kajian sistematik pada 76 kajian terdahulu mengenai genetik kepada pesakit MRKH atau ageneses Mullerian menunjukkan delesi pada lokasi kromosom 17q12, yang mengandungi gen LHX1 dikesan dalam sebahagian pesakit (Triantafyllidi et al. 2022). Walaupun gen LHX5 tidak berkait secara langsung dengan sindrom MRKH, beberapa kajian terdahulu menunjukkan protein LHX5 berkerjasama

dengan LHX1 untuk mengekalkan ekspresi protein yang terlibat dalam isyarat Hedgehog/Shh untuk perkembangan janin dan organ (Miquelajáuregui et al. 2015; Lui et al. 2017; Pillai et al. 2007).

Gen CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene) ini mengekod ahli superfamili pengangkut kaset pengikat ATP (ABC). Protein yang dikodkan berfungsi sebagai saluran klorida bagi mengawal rembesan dan penyerapan ion dan air di dalam tisu epitelium (Saint-Criq and Gray 2017). Terdapat beberapa kajian tentang gen CFTR dan perkaitannya dengan sindrom MRKH, tetapi perkaitan secara spesifik dan signifikan masih belum ditemui. Kajian terdahulu oleh beberapa kumpulan penyelidik menunjukkan mutasi gen CFTR berkait rapat dengan ketiadaan kongenital duktus deferens (CBAVD, congenital bilateral absence of the vas deferens) (Ghouchanatigh et al. 2022; Yuan et al. 2019). Disebabkan perkembangan embriologi duktus Mullerian bergantung kepada pembentukan duktus Wolffian yang normal (pendahulu kepada duktus deferens) (Mullen and Behringer 2014), produk gen CFTR ini adalah penting untuk perkembangan normal kedua-dua duktus ini. Oleh yang demikian, adalah tidak mustahil mutasi CFTR juga boleh menyebabkan Mullerian ageneses seterusnya ketiadaan uterus dan/atau vagina pada individu tertentu. Perkara ini disokong oleh kajian yang melibatkan satu keluarga yang mempunyai masalah kesuburan iaitu empat lelaki dewasa dengan CBAVD dan satu wanita dewasa dengan ketiadaan kongenital rahim (CAU, congenital absence of the uterus). Di dalam kajian ini, mutasi heterozigot pada gen CFTR adalah berkemungkinan penyebab kepada ketidaksuburan kepada kesemua ahli keluarga tersebut tanpa mengira jantina (Ghouchanatigh et al. 2022). Malah dalam kajian lain yang dilakukan oleh Eksi dan rakan-rakan menggunakan teknik mikroatur CGH/SNP untuk mengenalpasti CNVs dan kawasan homozigotiti pada 16

pesakit MRKH Turki Anatolian menemui lima kawasan CNVs yang berbeza dalam 4/19 (21%) pesakit (Demir Eksi et al. 2018). Satu daripadanya adalah pada kawasan 16p11.2 dengan delesi yang mengandungi 32 gen. Pada dua pesakit MRKH, mereka berkongsi 42 kawasan homozigositi yang sama yang mengandungi lapan gen yang mungkin boleh menjadi sasaran penyebab MRKH iaitu gen RBM8A, CMTM7, CCR4, TRIM71, CNOT10, TP63, EMX2, dan CFTR (Demir Eksi et al. 2018). Walaubagaimanapun, kajian seterusnya diperlukan untuk mengesahkan kaitan ini.

Berdasarkan analisis pengayaan tapak jalan dan jaringan interaksi gen dan protein, kebanyakan fungsi 28 gen mutasi de novo adalah terlibat dalam proses pembangunan, pembezaan dan morfogenesis sel. Antara gen yang terlibat adalah DMD, GPRIN1, HERC1, KIF13B, MYO16, SEMA4F, MSN, MEX3C dan TRIO. Walaupun kesemua gen ini tidak pernah dilaporkan berkait langsung dengan sindrom MRKH, satu kajian dahulu menunjukkan bahawa gabungan protein kinesin KIF13B dan protein neuregulin 1 (NRG1) boleh berinteraksi dengan protein Teneurin (Xia et al. 2017). Teneurin adalah merupakan glikoprotein transmembran yang penting untuk lekatan antara sel dan ekspresi protein ini telah dilaporkan di dalam endometrium dan sistem pembiakan (Zhu et al. 2016; Tucker et al. 2007; Rebolledo-Jaramillo and Ziegler 2018). Malah kajian daripada Zhu dan rakan-rakan juga melaporkan ekspresi Teneurin-1 didapati lebih tinggi di dalam wanita yang mempunyai kecacatan pada saluran Mullerian (Zhu et al. 2016) dan Teneurin merupakan protein sasaran kepada EMX2 (gen yang dilaporkan berkaitan dengan MRKH) (Demir Eksi et al. 2018). Penemuan ini menunjukkan bahawa interaksi antara KIF13B-NRG1 dengan Teneurin berkemungkinan berkaitan dengan MRKH terutama pada pembentukan saluran Mullerian. Perkara ini juga disokong oleh kajian sel neuron

yang menunjukkan protein isyarat, WNT3A menggalakkan pelepasan WNT5A untuk mengaktifkan ekspresi Teneurin-3 dalam tapak jalan pengisyratan WNT (Bastías-Candia et al. 2019). Penemuan ini penting kerana kerosakan pada tapak jalan pengisyratan WNT dan molekul isyaratnya adalah salah satu daripada penyebab kecacatan saluran Mullerian (Tepekoy, Akkoyunlu, and Demir 2015) dan mutasi pada gen isyarat WNT (WNT4, WNT5A, WNT7A, WNT9B) telah dilaporkan dalam sindrom MRKH sebelum ini (Triantafyllidi et al. 2022; Ledig and Wieacker 2018; Layman 2014). Oleh itu, pengesahsahihan secara eksperimen diperlukan untuk mengesahkan interaksi di antara gabungan KIF13B-NRG1 dengan Teneurin serta peranan mereka di dalam isyarat WNT dan proses berkaitan dengan agenesis Mullerian dan sindrom MRKH.

KESIMPULAN

Penjujukan eksom boleh dilakukan bagi mengenalpasti mutasi yang menyebabkan Penyakit Jarang Jumpa, Sindrom MRKH. Berdasarkan data klinikal ibu yang normal, tetapi anaknya mempunyai MRKH, besar kemungkinan mutasi de-novo atau sporadik merupakan penyebab kepada MRKH pada pesakit ini. Keputusan penjujukan eksom menunjukkan terdapat 28 mutasi de-novo telah dikenalpasti pada pesakit ini. Gen yang dikenalpasti juga boleh berinteraksi diantara satu sama lain yang mungkin boleh menyebabkan MRKH pada pesakit ini. Walaubagaimanapun, kajian seterusnya adalah perlu memandangkan mutasi pada gen ini hanya dapat dikenalpasti pada sebahagian kecil pesakit MRKH ataupun ianya hanya dikenalpasti pada penyakit seakan MRKH. Kajian fungsi mutasi atau gen ini dalam proses pembentukan rahim dan faraj juga penting bagi mengesahkan keterlibatan gen ini dalam sindrom MRKH.

PENYATAAN ETIKA

Persetujuan termaklum diperoleh daripada semua subjek yang terlibat dalam kajian ini untuk penjujukan eksom (WES). Ujian WES dilakukan di bawah perkhidmatan diagnostik molekul yang ditawarkan oleh Institut Biologi Molekul Perubatan UKM (UMBI) bagi mereka yang menghidap Penyakit Jarang Jumpa di Hospital Canselor Tuanku Muhriz (HCTM).

PENGHARGAAN

Kajian ini dibiayai oleh Unit Genomik PPUKM-UMBI dan di bawah inisiatif Penyakit Jarang Jumpa.

RUJUKAN

- Adzhubei, I., D. M. Jordan, and S. R. Sunyaev. 2013. "Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2." *Curr Protoc Hum Genet* Chapter 7: Unit7.20. <https://doi.org/10.1002/0471142905.hg0720s76>.
- Alanis-Lobato, G., M. A. Andrade-Navarro, and M. H. Schaefer. 2017. "HIPPIE v2.0: enhancing meaningfulness and reliability of protein-protein interaction networks." *Nucleic Acids Res* 45 (D1): D408-D414. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw985>.
- Backhouse, B., C. Hanna, G. Robevska, J. van den Bergen, E. Pelosi, C. Simons, P. Koopman, A. Z. Juniarto, S. Grover, S. Faradz, A. Sinclair, K. Ayers, and T. Y. Tan. 2019. "Identification of Candidate Genes for Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser Syndrome Using Genomic Approaches." *Sex Dev* 13 (1): 26-34. <https://doi.org/10.1159/000494896>.
- Bastías-Candia, S., M. Martínez, J. M. Zolezzi, and N. C. Inestrosa. 2019. "Wnt Signaling Upregulates Teneurin-3 Expression via Canonical and Non-canonical Wnt Pathway Crosstalk." *Front Neurosci* 13: 505. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00505>.
- Chen, M. J., S. Y. Wei, W. S. Yang, T. T. Wu, H. Y. Li, H. N. Ho, Y. S. Yang, and P. L. Chen. 2015. "Concurrent exome-targeted next-generation sequencing and single nucleotide polymorphism array to identify the causative genetic aberrations of isolated Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome." *Hum Reprod* 30 (7): 1732-42. <https://doi.org/10.1093/humrep/dev095>.
- Chmel, R., Jr., Z. Pastor, M. Mužík, T. Brtnický, and M. Nováčková. 2019. "Syndrome Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser - uterine and vaginal agenesis: current knowledge and therapeutic options." *Ceska Gynekol* 84 (5): 386-392.
- Choi, Y., G. E. Sims, S. Murphy, J. R. Miller, and A. P. Chan. 2012. "Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels." *PLoS One* 7 (10): e46688. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046688>.
- Cingolani, P., A. Platts, L. Wang le, M. Coon, T. Nguyen, L. Wang, S. J. Land, X. Lu, and D. M. Ruden. 2012. "A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3." *Fly (Austin)* 6 (2): 80-92. <https://doi.org/10.4161/fly.19695>.
- Demir Eksi, D., Y. Shen, M. Erman, L. P. Chorich, M. E. Sullivan, M. Bilekdemir, E. Yılmaz, G. Luleci, H. G. Kim, O. M. Alper, and L. C. Layman. 2018. "Copy number variation and regions of homozygosity analysis in patients with MÜLLERIAN aplasia." *Mol Cytogenet* 11: 13. <https://doi.org/10.1186/s13039-018-0359-3>.
- Doncheva, N. T., J. H. Morris, J. Gorodkin, and L. J. Jensen. 2019. "Cytoscape StringApp: Network Analysis and Visualization of Proteomics Data." *J Proteome Res* 18 (2): 623-632. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.8b00702>.
- Franz, M., H. Rodriguez, C. Lopes, K. Zuberi, J. Montojo, G. D. Bader, and Q. Morris. 2018. "GeneMANIA update 2018." *Nucleic Acids Res* 46 (W1): W60-w64. <https://doi.org/10.1093/nar/gky311>.
- Ghouchanatigh, M. D., R. Khan, M. Mojarrad, U. Hameed, M. Zubair, A. Waqas, M. Jalali, M. Kalantari, A. Shamsa, H. Zhang, and Q. H. Shi. 2022. "CFTR mutations causing congenital unilateral

- absence of the vas deferens (CUAVD) and congenital absence of the uterus (CAU) in a consanguineous family." *Asian J Androl* 24 (4): 416-421. <https://doi.org/10.4103/aja202177>.
- Haw, R. A., D. Croft, C. K. Yung, N. Ndegwa, P. D'Eustachio, H. Hermjakob, and L. D. Stein. 2011. "The Reactome BioMart." Database (Oxford) 2011: bar031. <https://doi.org/10.1093/database/bar031>.
- Herlin, M. K., V. Q. Le, A. T. Højland, A. Ernst, H. Okkels, A. C. Petersen, M. B. Petersen, and I. S. Pedersen. 2019. "Whole-exome sequencing identifies a GREB1L variant in a three-generation family with Müllerian and renal agenesis: a novel candidate gene in Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) syndrome. A case report." *Hum Reprod* 34 (9): 1838-1846. <https://doi.org/10.1093/humrep/dez126>.
- Jassal, B., L. Matthews, G. Viteri, C. Gong, P. Lorente, A. Fabregat, K. Sidiropoulos, J. Cook, M. Gillespie, R. Haw, F. Loney, B. May, M. Milacic, K. Rothfels, C. Sevilla, V. Shamovsky, S. Shorser, T. Varusai, J. Weiser, G. Wu, L. Stein, H. Hermjakob, and P. D'Eustachio. 2020. "The reactome pathway knowledgebase." *Nucleic Acids Res* 48 (D1): D498-d503. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1031>.
- Kanehisa, M., Y. Sato, M. Kawashima, M. Furumichi, and M. Tanabe. 2016. "KEGG as a reference resource for gene and protein annotation." *Nucleic Acids Res* 44 (D1): D457-62. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1070>.
- Kircher, M., D. M. Witten, P. Jain, B. J. O'Roak, G. M. Cooper, and J. Shendure. 2014. "A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants." *Nat Genet* 46 (3): 310-5. <https://doi.org/10.1038/ng.2892>.
- Kumar, P., S. Henikoff, and P. C. Ng. 2009. "Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm." *Nat Protoc* 4 (7): 1073-81. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.86>.
- Layman, L. C. 2014. "The genetics of Mullerian aplasia." *Expert Rev Endocrinol Metab* 9 (4): 411-419. <https://doi.org/10.1586/17446651.2014.914433>.
- Ledig, S., S. Brucker, G. Barresi, J. Schomburg, K. Rall, and P. Wieacker. 2012. "Frame shift mutation of LHX1 is associated with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) syndrome." *Hum Reprod* 27 (9): 2872-5. <https://doi.org/10.1093/humrep/des206>.
- Ledig, S., C. Schippert, R. Strick, M. W. Beckmann, P. G. Oepelt, and P. Wieacker. 2011. "Recurrent aberrations identified by array-CGH in patients with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome." *Fertil Steril* 95 (5): 1589-94. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.07.1062>.
- Ledig, S., and P. Wieacker. 2018. "Clinical and genetic aspects of Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome." *Med Genet* 30 (1): 3-11. <https://doi.org/10.1007/s11825-018-0173-7>.
- Liszewska-Kapłon, M., M. Strózik, Ł Kotarski, M. Bağlaj, and L. Hirnle. 2020. "Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome as an interdisciplinary problem." *Adv Clin Exp Med* 29 (4): 505-511. <https://doi.org/10.17219/acem/118850>.
- Lui, N. C., W. Y. Tam, C. Gao, J. D. Huang, C. C. Wang, L. Jiang, W. H. Yung, and K. M. Kwan. 2017. "Lhx1/5 control dendritogenesis and spine morphogenesis of Purkinje cells via regulation of Espin." *Nat Commun* 8: 15079. <https://doi.org/10.1038/ncomms15079>.
- Miquelajúregui, A., T. Sandoval-Schaefer, M. Martínez-Armenta, L. Pérez-Martínez, A. Cárabez, Y. Zhao, M. Heide, G. Alvarez-Bolado, and A. Varela-Echavarría. 2015. "LIM homeobox protein 5 (Lhx5) is essential for mamillary body development." *Front Neuroanat* 9: 136. <https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00136>.
- Morcel, K., L. Camborieux, and D. Guerrier. 2007. "Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) syndrome." *Orphanet J Rare Dis* 2: 13. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-2-13>.
- Mullen, R. D., and R. R. Behringer. 2014. "Molecular genetics of Müllerian duct formation, regression and differentiation." *Sex Dev* 8 (5): 281-96. <https://doi.org/10.1159/000364935>.

- Pillai, A., A. Mansouri, R. Behringer, H. Westphal, and M. Goulding. 2007. "Lhx1 and Lhx5 maintain the inhibitory-neurotransmitter status of interneurons in the dorsal spinal cord." *Development* 134 (2): 357-66. <https://doi.org/10.1242/dev.02717>.
- Quang, D., Y. Chen, and X. Xie. 2015. "DANN: a deep learning approach for annotating the pathogenicity of genetic variants." *Bioinformatics* 31 (5): 761-3. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu703>.
- Raudvere, U., L. Kolberg, I. Kuzmin, T. Arak, P. Adler, H. Peterson, and J. Vilo. 2019. "g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update)." *Nucleic Acids Res* 47 (W1): W191-w198. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz369>.
- Rebolledo-Jaramillo, B., and A. Ziegler. 2018. "Teneurins: An Integrative Molecular, Functional, and Biomedical Overview of Their Role in Cancer." *Front Neurosci* 12: 937. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00937>.
- Robinson, J. T., H. Thorvaldsdóttir, A. M. Wenger, A. Zehir, and J. P. Mesirov. 2017. "Variant Review with the Integrative Genomics Viewer." *Cancer Res* 77 (21): e31-e34. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-17-0337>.
- Saint-Criq, V., and M. A. Gray. 2017. "Role of CFTR in epithelial physiology." *Cell Mol Life Sci* 74 (1): 93-115. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2391-y>.
- Schwarz, J. M., C. Rödelsperger, M. Schuelke, and D. Seelow. 2010. "MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations." *Nat Methods* 7 (8): 575-6. <https://doi.org/10.1038/nmeth0810-575>.
- Shannon, P., A. Markiel, O. Ozier, N. S. Baliga, J. T. Wang, D. Ramage, N. Amin, B. Schwikowski, and T. Ideker. 2003. "Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks." *Genome Res* 13 (11): 2498-504. <https://doi.org/10.1101/gr.1239303>.
- Shihab, H. A., J. Gough, D. N. Cooper, P. D. Stenson, G. L. Barker, K. J. Edwards, I. N. Day, and T. R. Gaunt. 2013. "Predicting the functional, molecular, and phenotypic consequences of amino acid substitutions using hidden Markov models." *Hum Mutat* 34 (1): 57-65. <https://doi.org/10.1002/humu.22225>.
- Smedley, D., S. Haider, B. Ballester, R. Holland, D. London, G. Thorisson, and A. Kasprzyk. 2009. "BioMart--biological queries made easy." *BMC Genomics* 10: 22. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-22>.
- Sulaiman, Siti Aishah, Nor Azian Abdul Murad, Yock Ping Chow, Zam Zureena Mohd Rani, Salwati Shuib, Dayang Anita A. Aziz, Hana Azhari, Sharifah Azween Syed Omar, Zarina Abdul Latiff, and Rahman Jamal. 2018. "Mutations in KIF27, GNAS and IFT140 genes in a patient with VACTERL association: a case report. ." *Asia-Pacific Journal of Molecular Medicine* 8 (2): 1-10.
- Szklarczyk, D., A. L. Gable, K. C. Nastou, D. Lyon, R. Kirsch, S. Pyysalo, N. T. Doncheva, M. Legeay, T. Fang, P. Bork, L. J. Jensen, and C. von Mering. 2021. "The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets." *Nucleic Acids Res* 49 (D1): D605-d612. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1074>.
- Tepekoy, F., G. Akkoyunlu, and R. Demir. 2015. "The role of Wnt signaling members in the uterus and embryo during pre-implantation and implantation." *J Assist Reprod Genet* 32 (3): 337-46. <https://doi.org/10.1007/s10815-014-0409-7>.
- Thomson, E., M. Tran, G. Robevska, K. Ayers, J. van der Bergen, P. G. Bhaskaran, E. Haan, S. Cereghini, A. Vash-Margita, M. Margetts, A. Hensley, Q. Nguyen, A. Sinclair, P. Koopman, and E. Pelosi. 2022. "Functional genomics analysis identifies loss of HNF1B function as a cause of Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome." *Hum Mol Genet*. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddac262>.
- Thorvaldsdóttir, H., J. T. Robinson, and J. P. Mesirov. 2013. "Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration." *Brief Bioinform* 14 (2):

- 178-92.
<https://doi.org/10.1093/bib/bbs017>.
- Triantafyllidi, V. E., D. Mavrogianni, A. Kalampalikis, M. Litos, S. Roidi, and L. Michala. 2022. "Identification of Genetic Causes in Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) Syndrome: A Systematic Review of the Literature." *Children (Basel)* 9 (7). <https://doi.org/10.3390/children9070961>.
- Tucker, R. P., D. Kenzelmann, A. Trzebiatowska, and R. Chiquet-Ehrismann. 2007. "Teneurins: transmembrane proteins with fundamental roles in development." *Int J Biochem Cell Biol* 39 (2): 292-7. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.09.012>.
- Wang, K., M. Li, and H. Hakonarson. 2010. "ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data." *Nucleic Acids Res* 38 (16): e164. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq603>.
- Williams, L. S., D. Demir Eksi, Y. Shen, A. C. Lossie, L. P. Chorich, M. E. Sullivan, J. A. Phillips, 3rd, M. Erman, H. G. Kim, O. M. Alper, and L. C. Layman. 2017. "Genetic analysis of Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome in a large cohort of families." *Fertil Steril* 108 (1): 145-151.e2. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.05.017>.
- Xia, D., L. P. Le, A. J. Iafrate, and J. Lennerz. 2017. "KIF13B-NRG1 Gene Fusion and KRAS Amplification in a Case of Natural Progression of Lung Cancer." *Int J Surg Pathol* 25 (3): 238-240. <https://doi.org/10.1177/1066896917693092>.
- Yuan, P., Z. K. Liang, H. Liang, L. Y. Zheng, D. Li, J. Li, J. Zhang, J. Tian, L. H. Lai, K. Zhang, Z. Y. He, Q. X. Zhang, and W. J. Wang. 2019. "Expanding the phenotypic and genetic spectrum of Chinese patients with congenital absence of vas deferens bearing CFTR and ADGRG2 alleles." *Andrology* 7 (3): 329-340. <https://doi.org/10.1111/andr.12592>.
- Zhao, Y., E. Hermes, M. C. Yarolin, and H. Westphal. 2000. "Genomic structure, chromosomal localization and expression of the human LIM-homeobox gene LHX5." *Gene* 260 (1-2): 95-101. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(00\)00466-2](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(00)00466-2).
- Zhu, Y., M. Luo, H. Huang, X. Du, D. Chen, Q. Xing, B. Wang, and Y. Cao. 2016. "HOXA10, EMX2 and TENM1 expression in the mid-secretory endometrium of infertile women with a Müllerian duct anomaly." *Reprod Biomed Online* 32 (4): 388-93. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2016.01.005>.