

차세대 염기서열분석을 이용한 유전성 대사질환의 유전진단

GC지놈

기 창 석

Genetic Diagnosis of Inherited Metabolic Disorders using Next-Generation Sequencing

Chang-Seok Ki, MD, PhD

GC Genome, Yongin-si, Gyeonggi-do, Korea

Inherited metabolic disorders (IMD) are a group of disorders involving various metabolic pathways. Genetic diagnosis of IMD has been challenging because of extremely heterogeneous nature and extensive laboratory and/or phenotype overlap. Conventional genetic diagnosis was a gene-by-gene approach that needs a priori information on the causative genes that might underlie the IMD. Recent implementation of next-generation sequencing (NGS) technologies has changed the process of genetic diagnosis from a gene-by-gene approach to simultaneous analysis of targeted genes possibly associated with the IMD using gene panels or using whole exome/genome sequencing (WES/WGS) covering entire human genes. Clinical NGS tests can be a cost-effective approach for the rapid diagnosis of IMD with genetic heterogeneity and are becoming standard diagnostic procedures.

Key words: Next-generation sequencing, NGS, Inborn errors of metabolism, Gene panel, Whole exome sequencing, Whole genome sequencing

서 론

유전성 대사질환은 생화학적 대사 이상에 의해 발생하는 질환으로 정의되며, 2021년 제안된 국제 분류 체계에 따르면 1,450여개 질환이 포함될 만큼 매우 다양하다¹⁾. 유전성 대사질환은 내분비계나 면역계 등 하나의 장기 또는 시스템과 관련된 기능에 영향을 미치는 경우와 다양한 장기나 세포에 존재하는 공통 대사 경로에 영향을 미치는 경우 등으로 분류되기도 한다²⁾.

유전성 대사질환의 다양성과 복잡성으로 인해 증상 발생부터 진단에 이르기까지 매우 어려운 경우가 많은데, 빠르고 정확한 진단을 위해 가장 중요한 것은 유전질환을 의심하고 이를 확인하기 위해 필요한 진단검사와

유전자검사를 시행하는 것이다(Table 1). 과거에는 유전성 대사질환이 의심될 경우 최대한 특정 질환을 의심할 수 있는 단계까지 검사를 시행하여 어떤 유전자를 검사할지 결정해야 했다. 국내 최초로 보고된 당원축적병 제1b형 사례의 경우, 혈액검사를 비롯하여, 효소활성검사, 조직검사 등을 시행한 후 당원축적병 제1b형의 원인 유전자인 *SLC37A4* 유전자에 대해 고식적인 Sanger 염기서열분석을 시행하여 변이를 확인했다³⁾. 이 사례는 전통적인 유전 진단 과정을 잘 보여준다. 즉, 유전성 대사질환 의심 환자에서 유전 진단을 수행하려면 먼저 질병의 원인이 되는 유전자를 한 개 수준까지 좁힌 후 Sanger 염기서열분석 방법으로 유전자 검사를 수행하고, 질병 관련 변이가 발견되면 유전 진단이 완료된다(Fig. 1A).

그런데, 2009년 임상 진단이 잘못되었음에도 불구하고 유전자검사를 통해 역으로 진단에 성공한 사례가 보고되었다. 5개월 된 소년이 성장 부진과 탈수 증상 등을

책임저자: 기창석, 경기도 용인시 기흥구 이현로 30번길 107
GC지놈
Tel: 031)260-0601, Fax: 031)260-9087
E-mail: changski.md@gmail.com

바탕으로 바터증후군(Bartter syndrome)이 의심되었지만, 바터증후군 관련 유전자에 대한 Sanger 염기서열분석에서 변이가 발견되지 않았다. 기존에 알려져 있지 않은 유전자로 인한 바터증후군일 가능성을 알아보기 위해 새로운 기술로 등장하고 있던 전장 엑솜 시퀀싱(Whole Exome Sequencing)이 시행되었다. 전장 엑솜 시퀀싱은 차세대 염기서열분석(Next-Generation Sequencing; NGS) 기법을 이용하여 20,000여개 이상의 인간 유전자의 단백질 부호화 부위인 엑손(Exon) 부위 전체를 한 번에 분석하는 방법이다. 전장 엑솜 시퀀싱 결과 뜻밖에도 이미 유전자가 밝혀져 있는 선천성 염소 설사(Congenital Chloride Diarrhea)의 원인 유전자인 *SLC26A3*에서 질병 관련 변이가 발견되어 환자는 선천성 염소 설사로 진단되었다⁴⁾.

이 사례에서 보듯이 NGS는 유전 진단의 패러다임을 바꾸었다. 과거에는 유전 진단을 위해 질병을 일으키는 유전자를 선정한 후 Sanger 염기서열분석을 통해 중요한 유

전자 순서대로 분석해야 했다. 그러나 NGS 기술이 발전함에 따라 유전 질환이 의심되는 경우 수십, 수백 또는 인간의 모든 유전자를 한 번에 분석하여 질병 관련 변이를 찾을 수 있게 되었다(Fig. 1B).

본 론

1. 차세대 염기서열분석법을 이용한 유전진단 방법

NGS는 대규모 병렬 염기서열분석(Massive Parallel Sequencing; MPS)이라는 검사 기법의 특성 때문에 단일 유전자를 분석하는 것은 비효율적인 반면, 수십, 수백 또는 전체 인간 유전자를 동시에 분석하는 데 매우 유용하다. NGS를 이용한 유전 진단 방법은 유전자의 구성 및 분석 범위에 따라 표적 유전자 패널(Targeted Gene Panel; TGP), 전장 엑솜 시퀀싱 및 전장 유전체 시퀀싱(Whole

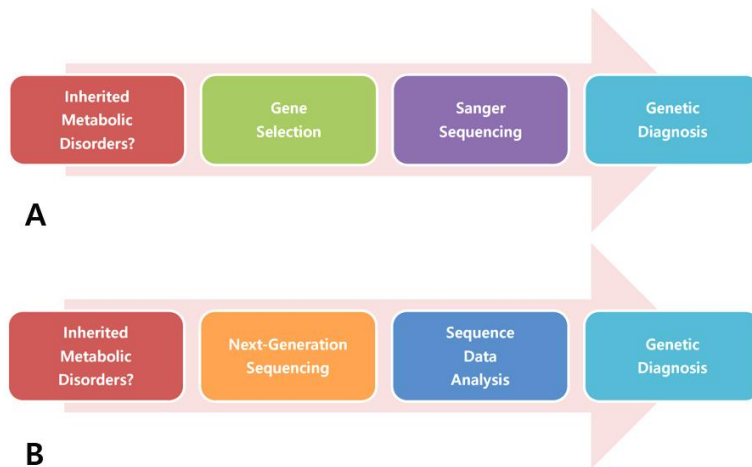


Fig. 1. Paradigm changes of genetic diagnosis. A) Traditional gene-by-gene approach using Sanger sequencing. B) Syndrome-based genetic diagnosis process by using next-generation sequencing (NGS).

Table 1. Questions for the genetic diagnosis of inherited metabolic disorders

| |
|---|
| Are the patient's symptoms, signs, or laboratory findings related to an inherited metabolic disorder (IMD)? |
| Have the causal genes for the IMD been identified? |
| How many causative genes are there underlying the IMD? |
| Are there any major genes for the IMD? |
| How to test for genes that cause the IMD? |
| Are there any variants found in genetic testing? |
| How do we verify that the genetic variant we find is the cause of the IMD? |
| If genetic testing didn't find any causative variants, what should we do now? |

Genome Sequencing; WGS) 등으로 나눌 수 있다⁵⁾.

유전진단 목적으로 시행하는 NGS에서 표적 유전자 패널, 전장 엑솜 시퀀싱 및 전장 유전체 시퀀싱의 차이는 30억개 서열로 구성된 인간 유전체 중에서 얼마나 많은 부분이 분석되는지(유전체 커버리지)와 특정 서열이 얼마나 많이 읽혀지는지(시퀀싱 디프)로 표현될 수 있다. 전장 유전체 시퀀싱의 유전체 커버리지는 90-95%이고 시퀀싱 디프는 약 30-60x이며, 전장 엑솜 시퀀싱의 유전체 커버리지와 시퀀싱 디프는 각각 약 1-2%와 약 100-200 x이며, 표적 유전자 패널은 각각 0.01-0.1%와 약 200-500 x인데, 각각의 방법은 다양한 측면에서 장단점이 있다 (Table 2).

2. 유전성 대사질환 표적 유전자 패널

표적 유전자 패널은 표적 엑솜(Targeted Exome) 또는 표적 패널(Targeted Panel) 등으로도 불리며, 유전성 대사질환과 관련된 수백 개의 유전자를 선정하여 해당 유전자의 코딩 엑솜과 인접한 인트론 부위에 대해 NGS 기법으로 염기서열분석을 시행하는 방법으로서, 임상 진단에 가장 널리 활용되고 있다⁶⁾.

유전성 대사질환의 정의가 매우 광범위하고 원인 유전자도 매우 많기 때문에 패널을 구성할 때 어떤 유전자를 포함해야 하는지 결정해야 한다. 표적 유전자 패널의 크기가 클수록 검사 비용이 증가하고, 시퀀싱 디프가 낮아짐에 따라 염기서열분석에서 일부 엑손 부위가 빠질 수

있기 때문에 유전자의 구성은 매우 신중하게 결정해야 한다. 또한, 인종이나 민족, 질환의 유병율과 대상 환자군의 연령 및 주요 임상양상에 따라 매우 다양한 패널 구성이 가능할 수 있다.

예를 들어, 영국의 National Health Service (NHS)에서 제공하는 Genomic Medicine Service (GMS) 패널 정보 사이트에서 유전성 대사질환과 관련된 패널을 검색해보면 질환별 패널 및 전체 유전성 대사질환이 포함된 패널 등이 검색된다⁷⁾. 이 사이트에서 유전성 대사질환 관련 표적 유전자 패널은 총 8개가 등록되어 있는데, 각 패널별 유전자 수와 유전자-질환 연관성 수준에 따라 Green, Amber, Red 등으로 각 유전자들이 분류되어 있다(Table 3). 만약 임상 진단 목적으로 유전성 대사질환 패널을 제작하고자 할 경우, Green 유전자는 필수적으로 포함되어야 하고 Red 유전자는 제외되어야 하겠지만, Amber 유전자와 아직 충분히 검토되지 않은 유전자의 경우 패널에 포함할지 배제할지 검토가 필요하다.

3. 전장 엑솜 시퀀싱

전장 엑솜 시퀀싱은 유전 질환 관련 유전자(Mendeliome) 또는 모든 인간 유전체(Whole Exome)의 코딩 엑손 및 인접 인트론 부위를 분석하는 NGS 분석 방법이다. 전장 엑솜 시퀀싱은 타겟 유전자 패널이 가장 광범위하게 확대된 것과 유사한데 NGS 기술이 실제 유전질환 진단에 활용될 수 있음을 최초로 보여준 기술일 뿐만 아

Table 2. Comparison of clinical next-generation sequencing test

| | TPS | WES | WGS |
|-----------------------|-----------------|----------------------|------------------|
| Genome Coverage | Low | Intermediate | High |
| Sequencing Depth | High | Intermediate | Low |
| Number of Genes | Up to thousands | More than 20,000 | More than 20,000 |
| Capture Bias | Yes | Yes | No |
| Diagnostic Yield | | | |
| SNV/INDEL | High | High to Intermediate | High |
| Intron Variant | Low | Low | High |
| CNV | Intermediate | Intermediate | High |
| Gene Rearrangement | Low | Low | High |
| Re-analysis Potential | Low | Intermediate to High | High |
| Cost | Low | Intermediate | High |

Abbreviations: CNV, copy number variation; INDEL, insertion and deletion; SNV, single nucleotide variant; TPS, targeted gene panel sequencing; WES, whole exome sequencing; WGS, whole genome sequencing.

나라, 새로운 유전질환 유전자 발견에 매우 큰 기여를 한 기술이다⁸⁾.

전장 엑솜 시퀀싱은 유전 질환과 연관성이 밝혀져 있지 않은 유전자도 포함되어 있으므로 최초 분석에서 질병 관련 유전자 변이가 발견되지 않더라도 데이터 재분석을 통해 새로운 원인 유전자를 발견할 수 있는 가능성이 있다⁹⁾. 비록 전장 엑솜 시퀀싱이 유전 진단에 매우 효율적인 방법이지만 일부 제한이 있는데, GC 비율이 높은 영역에 존재하는 변이를 비롯하여 결실(Deletion) 또는 중복(Duplication)과 같은 복제수 변이(Copy number variation; CNV)는 검출되지 않을 수 있다¹⁰⁾.

4. 전장 유전체 시퀀싱

전장 유전체 시퀀싱은 유전자의 코딩 엑손 부위 뿐만 아니라 엑손과 엑손 사이 인트론 영역과 유전자와 유전자 사이 비유전자 영역을 대부분 포함한 전체 인간 유전체를 분석하는 가장 포괄적인 방법이다. 이 방법은 시퀀싱 비용도 가장 비싸고, 시퀀싱을 통해 얻게 되는 데이터 크기도 약 100 Gb 혹은 그 이상으로 매우 커서 분석 비용도 매우 클 수밖에 없다. 그러나, 최근 NGS 장비와 시약 비용이 감소하고, 전장 유전체 시퀀싱을 통해 분석된 유전체 데이터가 표적 유전자 패널 및 전장 엑솜 시퀀싱보다 더 높은 균일성을 가지며, 전장 엑솜 시퀀싱에서 분석이 어려웠던 인트론과 비유전자 영역 및 GC 비율이 높은

영역을 분석할 수 있는 장점이 강조되고 있다⁵⁾.

전장 유전체 시퀀싱의 주요 장점으로는, 첫째, 대규모 결실 및 중복 뿐만 아니라 유전체 재배열과 같은 복제수 변이(CNV)를 검출할 수 있다. 타겟 유전자 패널이나 전장 엑솜 시퀀싱도 2-3개 이상의 엑손을 포함하는 복제수 변이를 검출할 수 있지만 전장 유전체 시퀀싱은 대부분의 복제수 변이 및 유전체 재배열을 감지할 수 있다¹¹⁾. 진단되지 않은 유전질환에 대해 전장 유전체 시퀀싱을 1차 검사로 시행한 결과에 따르면, 임상적으로 중요한 유전체 변이가 41명의 환자 중 68.3%에서 관찰되었으며, 그 중 20명은 복제수 변이 또는 큰 염색체 이상이였다¹²⁾. 둘째, 인트론 변이를 감지할 수 있는데, 타겟 유전자 패널과 전장 엑솜 시퀀싱에서 질병 관련 변이를 찾지 못한 일부 환자에서 인트론 변이에 의해 mRNA가 영향을 받을 수 있다¹³⁾.

5. 진단율(Diagnostic Yield)

NGS를 유전성 대사질환의 진단에 활용하고자 할 때 주요 증상을 설명할 수 있고 유전 양상에 합당한 질환 관련 변이가 발견되는 진단율을 사전에 파악하는 것은 매우 중요하다. 표적 유전자 패널은 유전자 구성에 따라 다양한 진단율을 보일 수 있다. 2016년 스페인에서 146명의 환자를 대상으로 171개의 유전자로 구성된 표적 유전자 패널로 검사를 했을 때 진단율은 50% (73/146)로 보고되

Table 3. Targeted next-generation sequencing panels for inherited metabolic disorders at Genomics England PanelApp*

| Panel name | Version | No. of genes | Curation status | | | |
|---------------------------------------|---------|--------------|--------------------|--------------------|------------------|-----------------------|
| | | | Green [†] | Amber [‡] | Red [§] | No list |
| Undiagnosed metabolic disorders | 1,607 | 754 | 654 | 22 | 76 | 2 |
| Cerebral folate deficiency | 1.2 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| Congenital disorders of glycosylation | 4.13 | 117 | 95 | 5 | 17 | 1 |
| Hyperammonaemia | 1.21 | 106 | 42 | 0 | 64 | 0 |
| Ketotic hypoglycaemia | 1.8 | 45 | 27 | 0 | 18 | 0 |
| Mitochondrial disorders | 4.113 | 483 | 277 | 41 | 160 | 5 |
| Mucopolysaccharidosis, Gaucher, Fabry | 1.2 | 18 | 17 | 0 | 1 | 0 |
| Peroxisomal disorders | 1.19 | 38 | 35 | 0 | 3 | 0 |

*Genomics England PanelApp; <https://panelapp.genomicsengland.co.uk> (Date accessed: 22 Nov 2023).

[†]High level of evidence for this gene-disease association, demonstrates confidence that this gene should be used for genome interpretation.

[‡]Moderate evidence for this gene-disease association, and should not yet be used for genome interpretation.

[§]Not enough evidence for this gene-disease; this gene should not be used for genome interpretation.

^{||}Added for review of gene-disease association or removed after review because of the variant type (short tandem repeat, etc.).

었다¹⁴). 특히 임상 소견 및 생화학적 검사에서 유전성 대사질환 가능성이 높았던 81명의 환자군에서는 78% (63/81)의 높은 진단율을 보인 반면, 임상 소견은 유전성 대사질환이 의심되었으나 생화학적 검사 소견이 비특이적이었던 65명의 환자군에서는 15% (10/65)의 낮은 진단율을 보였다.

표적 유전자 패널을 이용한 또 다른 연구에서는, 311명의 유전성 대사질환 환자 중 31.8% (83/311)의 진단율을 보고하였고, 의심되는 유전성 대사질환의 종류에 따라 대사물질이 축적되는 질환군(61.9%), 백색질 형성장애와 같은 복합 물질 결핍 질환군(32.8%), 저혈당 또는 고혈당 증상군(19.0%), 미토콘드리아 질환(17.0%) 등 질환군에 따라 다양한 진단율을 보였다⁶).

유전성 대사질환에서 전장 엑솜 시퀀싱의 진단율도 16-68%로 다양하게 보고되고 있다¹⁵). 전장 엑솜 시퀀싱은 유전성 대사 질환이 의심되는 환자에서 유전 진단 목적으로 활용되기도 하지만, 신생아 선별검사 목적으로 활용 가능성이 제안되기도 했다. 신생아 선별검사 목적의 전장 엑솜 시퀀싱의 민감도와 특이도는 각각 88%와 98.4%로서 기존의 탠덤매스의 민감도(99.0%)와 특이도(99.8%)에 비해 낮은 성능을 보였다. 반면 탠덤매스 선별검사서 비정상 결과를 보인 경우 2차 검사로 전장 엑솜 시퀀싱을 시행하였을 때는 위양성 결과를 줄일 수 있는 효과가 있었다¹⁶).

6. 차세대 염기서열분석으로 진단이 어려운 유전성 대사질환

현재 활용되고 있는 NGS 기술은 주로 50-300 bp 크기로 잘린 DNA 단편의 서열을 분석한 후 표준 서열을 참조하여 정렬하는 방식이다. 이 방법이 가지고 있는 한계점과 질환 관련 유전자 또는 주요 변이의 복잡한 구조로 인해 선천성 부신증식증, 제2형 뮤코다당축적병(헌터 증후군) 등 일부 유전성 대사질환은 NGS 기술을 이용한 유전 진단에 주의를 기울여야 한다.

예를 들어, 선천성 부신증식증 중 가장 흔한 21-수산화효소 결핍(21-hydroxylase deficiency)의 원인 유전자인 *CYP21A2*는 염기서열 상동성이 매우 높은 가짜 유전자(pseudogene)인 *CYP21A1P*로 인해 유전 진단이 기술

적으로 매우 까다롭다¹⁷). 이런 문제를 극복하기 위한 방법으로 대립유전자 특이 중합효소연쇄반응을 접목하거나¹⁸, 길이가 긴 DNA를 단편화하지 않고 전체 서열을 분석하는 방법(Long-read sequencing)들이 시도되고 있다¹⁹). 또한, 제2형 뮤코다당축적병의 경우 *IDS* 유전자의 가짜 유전자인 *IDS2*와 재배열 변이(*IDS-IDS2* recombination)의 경우 NGS로는 검출이 어렵기 때문에 별도의 검사를 시행하여야 한다²⁰).

7. 변이의 해석

NGS를 이용한 유전성 대사질환의 유전 진단 과정에서 변이의 해석은 매우 중요하다. 2015년 미국 의학유전학회와 분자병리학회에서는 객관적인 근거를 바탕으로 변이를 해석하는 가이드라인을 제시하였고, 기준에 돌연 변이(Mutation) 또는 단일염기 다형성(Single nucleotide polymorphism; SNP) 등으로 불리던 변이의 명명 방식 대신 병인성 변이(Pathogenic variant; PV), 준병원성 변이(Likely pathogenic variant; LPV), 의미 불분명 변이(Variant of uncertain significance; VUS), 비병원성 변이[Benign variant (BV) 또는 Likely benign variant (LBV)] 등으로 분류하도록 권고하였다²¹). 그러나, 변이를 해석하는 것은 여전히 매우 난이도가 높은 작업이며, 고려할 것들이 많다²²).

최근에는 2015년 제안된 ACMG/AMP 가이드라인을 발전시켜 각 질환 또는 유전자별로 변이 해석 가이드라인을 제안하거나, 개별 근거에 대한 객관적인 적용 방법을 제안되기도 하였다²³⁻²⁵). 이러한 노력의 일환으로 페닐케톤뇨증의 경우 ClinGen IEM Working Group에 의해 변이 해석에 대한 별도의 가이드라인이 제시되었다²⁶).

결론

NGS 기술은 유전 진단의 패러다임을 바꾸었다. 표적 유전자 패널은 실제 임상 현장에서 가장 빈번하게 사용되고 있고, 전장 엑솜 시퀀싱과 전장 유전체 시퀀싱도 활용도가 높아지고 있다. 그러나 이러한 NGS 기반의 유전 검사를 사용하더라도 약 50%의 환자가 확정 진단에 이르지 못할 가능성을 염두에 두어야 한다. 따라서, 최고의 진단

을 얻기 위해서는 환자를 진료하는 의료진은 임상 양상과 검사 소견을 바탕으로 NGS 혹은 다른 적절한 검사 방법을 선택하여야 하고, 판독을 담당하는 의료진에게 자세한 임상 정보를 제공하여야 한다.

요 약

유전성 대사질환은 생화학적 대사 이상에 의해 발생하는 질환 군으로, 매우 다양할 뿐만 아니라 임상 양상이 서로 겹칠 수 있어 진단에 어려움을 겪을 수 있다. 과거에는 유전성 대사질환의 원인이 될 수 있는 유전자를 선정한 후 한 개씩 분석하는 방식으로 유전자 검사를 시행했다. 하지만, 최근에는 차세대 염기서열분석 기술이 발전함에 따라 유전성 대사질환과 관련된 수백-수천개의 유전자를 한꺼번에 분석하거나, 인간의 모든 유전자를 포함하는 엑솜/게놈 분석을 시행한 후 원인 유전자를 찾는 방식으로 유전 진단의 패러다임이 바뀌고 있다. 본 종설에서는 차세대 염기서열분석을 이용한 유전성 대사질환의 유전 진단 방법과 진단을 및 주의점 등을 살펴보고자 한다.

참 고 문 헌

- 1) Ferreira CR, Rahman S, Keller M, Zschocke J; ICIMD Advisory Group. An international classification of inherited metabolic disorders (ICIMD). *J Inher Metab Dis* 2021;44:164-77.
- 2) Saudubray JM, Garcia-Cazorla A. Inborn Errors of Metabolism Overview: Pathophysiology, Manifestations, Evaluation, and Management. *Pediatr Clin North Am* 2018;65:179-208.
- 3) Han SH, Ki CS, Lee JE, Hong YJ, Son BK, Lee KH, et al. A novel mutation (A148V) in the glucose 6-phosphate translocase (SLC37A4) gene in a Korean patient with glycogen storage disease type 1b. *J Korean Med Sci* 2005;20:499-501.
- 4) Choi M, Scholl UI, Ji W, Liu T, Tikhonova IR, Zumbo P, et al. Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:19096-101.
- 5) Adams DR, Eng CM. Next-Generation Sequencing to Diagnose Suspected Genetic Disorders. *N Engl J Med* 2018;379:1353-62.
- 6) Barbosa-Gouveia S, Vázquez-Mosquera ME, González-Vioque E, Álvarez JV, Chans R, Laranjeira F, et al. Utility of Gene Panels for the Diagnosis of Inborn Errors of Metabolism in a Metabolic Reference Center. *Genes (Basel)* 2021;12:1262.
- 7) Martin AR, Williams E, Foulger RE, Leigh S, Daugherty LC, Niblock O, et al. PanelApp crowdsources expert knowledge to establish consensus diagnostic gene panels. *Nat Genet* 2019;51:1560-5.
- 8) Bamshad MJ, Ng SB, Bigham AW, Tabor HK, Emond MJ, Nickerson DA, Shendure J. Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nat Rev Genet* 2011;12:745-55.
- 9) Ewans LJ, Schofield D, Shrestha R, Zhu Y, Gayevskiy V, Ying K, et al. Whole-exome sequencing reanalysis at 12 months boosts diagnosis and is cost-effective when applied early in Mendelian disorders. *Genet Med* 2018;20:1564-74.
- 10) Meienberg J, Bruggmann R, Oexle K, Matyas G. Clinical sequencing: is WGS the better WES? *Hum Genet* 2016;135:359-62.
- 11) Brewer MH, Chaudhry R, Qi J, Kidambi A, Drew AP, Menezes MP, et al. Whole Genome Sequencing Identifies a 78 kb Insertion from Chromosome 8 as the Cause of Charcot-Marie-Tooth Neuropathy CMTX3. *PLoS Genet* 2016;12:e1006177.
- 12) Scocchia A, Wigby KM, Masser-Frye D, Del Campo M, Galarreta CI, Thorpe E, et al. Clinical whole genome sequencing as a first-tier test at a resource-limited dysmorphology clinic in Mexico. *NPJ Genom Med* 2019;4:5.
- 13) Vaz-Drago R, Custódio N, Carmo-Fonseca M. Deep intronic mutations and human disease. *Hum Genet* 2017;136:1093-1111.
- 14) Yubero D, Brandi N, Ormazabal A, Garcia-Cazorla A, Pérez-Dueñas B, Campistol J, et al. Targeted Next Generation Sequencing in Patients with Inborn Errors of Metabolism. *PLoS One* 2016;11:e0156359.
- 15) Shakiba M, Keramatipour M. Effect of Whole Exome Sequencing in Diagnosis of Inborn Errors of Metabolism and Neurogenetic Disorders. *Iran J Child Neurol* 2018;12:7-15.
- 16) Adhikari AN, Gallagher RC, Wang Y, Currier RJ, Amatuni G, Bassaganyas L, et al. The role of exome sequencing in newborn screening for inborn errors of metabolism. *Nat Med* 2020;26:1392-7.
- 17) Carvalho B, Marques CJ, Santos-Silva R, Fontoura M, Carvalho D, Carvalho F. Congenital Adrenal Hyperplasia Due to 21-Hydroxylase Deficiency: An Update on Genetic Analysis of CYP21A2 Gene. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2021;129:477-81.
- 18) Ravichandran L, Korula S, Asha HS, Varghese D, Parthiban R, Johnson J, et al. Allele-specific PCR and Next-generation sequencing based genetic screening

- ning for Congenital Adrenal Hyperplasia in India. *Eur J Med Genet* 2021;64:104369.
- 19) Li H, Zhu X, Yang Y, Wang W, Mao A, Li J, Bao S, Li J. Long-read sequencing: An effective method for genetic analysis of CYP21A2 variation in congenital adrenal hyperplasia. *Clin Chim Acta* 2023;547:117419.
 - 20) La Cognata V, Cavallaro S. Detection of Structural Variants by NGS: Revealing Missing Alleles in Lysosomal Storage Diseases. *Biomedicines* 2022;10:1836.
 - 21) Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015;17:405-24.
 - 22) Kim YE, Ki CS, Jang MA. Challenges and Considerations in Sequence Variant Interpretation for Mendelian Disorders. *Ann Lab Med* 2019;39:421-9.
 - 23) Abou Tayoun AN, Pesaran T, DiStefano MT, Oza A, Rehm HL, Biesecker LG, et al. Recommendations for interpreting the loss of function PVS1 ACMG/AMP variant criterion. *Hum Mutat* 2018;39:1517-24.
 - 24) Biesecker LG, Harrison SM; ClinGen Sequence Variant Interpretation Working Group. The ACMG/AMP reputable source criteria for the interpretation of sequence variants. *Genet Med* 2018;20:1687-8.
 - 25) Brnich SE, Abou Tayoun AN, Couch FJ, Cutting GR, Greenblatt MS, Heinen CD, et al. Recommendations for application of the functional evidence PS3/BS3 criterion using the ACMG/AMP sequence variant interpretation framework. *Genome Med* 2019;12:3.
 - 26) Zastrow DB, Baudet H, Shen W, Thomas A, Si Y, Weaver MA, et al. Unique aspects of sequence variant interpretation for inborn errors of metabolism (IEM): The ClinGen IEM Working Group and the Phenylalanine Hydroxylase Gene. *Hum Mutat* 2018;39:1569-80.