

# Detection of *ASXL1* Codon 646 Variant Using Amplicon-Based Next-Generation Sequencing

Miyoung Kim<sup>1</sup>, Nan Young Kim<sup>2</sup>, Sangkyoon Hong<sup>2</sup>, Jiwon Lee<sup>3</sup>, Yonggeun Cho<sup>4</sup>, Han-Sung Kim<sup>4</sup>, Hee Jung Kang<sup>4</sup>, and Young Kyung Lee<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Laboratory Medicine, Asan Medical Center, University of Ulsan College of Medicine, Seoul; <sup>2</sup>Hallym Institute of Translational Genomics and Bioinformatics, Hallym University Medical Center, Anyang; <sup>3</sup>Department of Laboratory Medicine, Green Cross Laboratories, Yongin; <sup>4</sup>Department of Laboratory Medicine, Hallym University Sacred Heart Hospital, Hallym University College of Medicine, Anyang, Korea

## Corresponding author:

Miyoung Kim  
Department of Laboratory Medicine,  
Asan Medical Center, University of Ulsan  
College of Medicine, 88 Olympic-ro 43-  
gil, Songpa-gu, Seoul 05505, Korea  
Tel +82-2-3010-4498  
E-mail miyoungkim@amc.seoul.kr

**Received:** December 16, 2021

**Revised:** April 20, 2022

**Accepted:** April 25, 2022

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Background:** The *ASXL1* codon 646 variant is the most common *ASXL1* variant that negatively impacts the prognoses of patients with myeloid malignancies, particularly those with myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. However, it has been suggested that this mutation is not somatic but rather an artifact of next-generation sequencing (NGS) owing to its location in an 8 bp guanine mononucleotide repeat. In this study, we evaluated the performance of amplicon-based NGS in discriminating the *ASXL1* codon 646 variant.

**Methods:** Amplicon-based NGS was performed on the Myeloid DNA Reference Standard HD829 in varying reference material dilution ratios using the TruSight Myeloid panel and a MiSeqDx system.

**Results:** The expected and measured variant allele frequencies (VAFs) of the *ASXL1* codon 646 mutation in the reference material were 40.00% and 18.65%, respectively. The measured VAFs in reference materials serially diluted at 1:1, 1:2, 1:4, and 1:8 were 9.09%, 5.82%, 1.92%, and 2.87%, respectively ( $y=0.4391x+0.8642$ ;  $r^2=0.9846$ ). Most of the other variants showed VAFs comparable to expected VAFs.

**Conclusions:** The measured allele frequencies of the *ASXL1* codon 646 variant in the serially diluted reference materials were approximately half their expected values, suggesting difficulties in the correct detection of the variant using amplicon-based NGS.

**(Lab Med Qual Assur 2022;44:76-81)**

**Key Words** *ASXL1*, Amplicon, Variant allele frequency, Next-generation sequencing

## 서론

*ASXL1* (additional sex combs like 1) 유전자는 염색체 20q11에 위치하는 유전자로 후성유전학적 변형(epigenetic modification)에 관여하는 것으로 알려져 있다[1,2]. 이 유전자의 변이는 만성골수단구백혈병(약 45%), 일차골수섬유증(약 35%), 급성골수성백혈병(약 30%)을 비롯하여, 모든 종류의 클론성 골

수구계 질환에서 가장 흔히 관찰되는 변이 중 하나이다[1,3]. 또한 *ASXL1* 유전자의 변이는 *DNMT3A*, *TET2* 유전자와 함께 노화에 따른 클론성 조혈증(age-related clonal hematopoiesis)에서 가장 흔히 관찰되는 변이이다[2]. *ASXL1* 유전자의 변이가 있는 경우, 그렇지 않은 경우에 비해 불량한 예후를 시사한다는 것은 여러 기존 연구들에 의해 밝혀져 있다[3].

*ASXL1* 유전자의 변이는 대부분 12번 엑손(exon)에 존

재하는데, 약 50% 이상이 guanine의 반복(duplication; c.1934dupG)으로 인한 틀이동변이(frameshift mutation)이다 (p.Gly646TrpfsX12). ASXL1 유전자의 1927번 염기부터 1934번 염기까지는 단일염기중합체(homopolymer)라 할 수 있는 구아닌(guanine)이 8개가 연속된 서열인데, 몇 연구에 따르면, 이 단일염기중합체 구역은 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)에서 오류가 발생할 수 있는 부분으로, 해당 변이는 실제 변이가 아닌 인공산물일 가능성이 제시되었다[4,5]. Abdel-Wahab 등[4]은 골수구계 질환이 있는 환자와 그렇지 않은 환자의 종양 검체와 구강상피세포 검체를 이용하여 ASXL1 코돈 646 부위를 직접염기순서검사법(direct sequencing)과 질량분석기(mass spectrometry)로 검사하였다. 연구자들은 골수구계 질환 환자와 그렇지 않은 환자에서, 또한 종양 검체와 구강상피세포 검체 모두에서 이 변이를 관찰하였고, 이를 근거로 이 변이는 실제 존재하는 변이가 아닌 PCR과정에서 발생한 오류일 가능성을 제시하였다. Yannakou 등[5]은 골수구계 혈액질환을 가진 환자에서 직접염기순서검사법, 앰플리콘(amplicon) 방식의 차세대염기서열분석법, 정량실시간 중합효소연쇄반응(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)을 이용하여 이 변이를 확인하였다. 연구자들은 이 변이는 실제 존재하는 변이가 맞으나 앰플리콘 기반의 차세대염기서열분석법에서는 위음성이나 인공산물 관련 위양성이 발생할 수 있으므로, qRT-PCR을 이용하여 확인하는 것이 중요하다고 제안하였다[5]. 반면, Alberti 등[6]과 Schnittger 등[7]은 이 변이는 실제 존재하는 변이가 맞으며, 특히 Alberti 등[6]은 차세대염기서열분석법에서 변이비율(variant allele frequency, VAF) 등을 이용하면 인공산물과 구별할 수 있다고 제시하였다.

이에 본 연구에서는 환자 검체와 상품화된 정도관리물질을 이용하여 앰플리콘 기반의 차세대염기서열분석법의 ASXL1 코돈 646 변이분석의 신뢰성을 평가하였다.

## 재료 및 방법

상품화된 정도관리물질인 Myeloid DNA Reference Standard (Horizon Discovery Ltd., Cambridge, UK)를 사용하였다. 이 물질은 ASXL1 G646Wfs\*12 변이를 포함하여, 골수구계 종양에서 흔히 관찰되는 ABL1 T315I, ASXL1 W796C, BCOR Q1208Tfs\*8, CBL S403F, DNMT3A R882C, EZH2 R418Q, FLT3 D835Y, FLT3 ITD300, GATA1 Q119\*, GATA2 G200Vfs\*18, IDH1 R132C, IDH2 R172K, JAK2 F537-K539>L, JAK2 V617F, KRAS G13D, NPM1 W288Cfs\*12, NRAS Q61L, RUNX1 M267I, SF3B1 G740E, TET2 R1261H, TP53 S241F의 22개의 변이를 가지고 있으며, VAF는 ASXL1 G646Wfs\*12 변이 40%를 비롯하

여 5%~70%로 다양하다. 이들의 희석에는 혈액종양으로 진단받지 않은 환자의 말초혈액 genomic DNA (gDNA)를 이용하였고, 희석은 원액, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8로 하였다. 단, 앰플리콘 기반 차세대염기서열에서 검출이 어려운 것으로 알려진 FLT3-ITD 변이는 분석에 포함되지 않았다. 본 연구는 한림대학교성심병원 임상시험심사위원회에서 승인을 받았다(IRB approval no., 2018-12-027).

골수구계 종양에서 흔히 변이가 관찰되는 54개의 유전자에 대한 앰플리콘 기반 차세대염기서열 분석패널인 TruSight Myeloid (Illumina, San Diego, CA, USA) 패널을 이용해 염기순서분석 라이브러리(library)를 제작하였고, MiSeq Dx (Illumina) 기기로 분석하였다. “Phred” 질 점수(quality score)가 30 이상, 염기순서 분석 깊이(read depth)가 500× 이상인 변이를 포함하였다.

Myeloid DNA Reference Standard에서 관찰되는 것으로 알려진 변이의 존재 유무를 비교하고, VAF의 기대값과 측정값의 관계를 Pearson’s correlation을 통해 분석하였다. VAF의 기대값과 측정값의 차이는 “discrepancy (%)”로 나타냈으며, 이 값은 [(측정 VAF-예상 VAF)/예상 VAF×100]으로 하였다. 분석에는 Excel 2016 (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA)을 이용하였다.

## 결과

Myeloid DNA Reference Standard에 존재하는 것으로 알려진 22개 변이는 원액으로 검사하였을 때 모두 검출되었다. 원액에서의 discrepancy (%)는 DNMT3A R882, ASXL1 G646fs\*12, NPM1 W288fs\*12를 제외하면 모두 35% 이하였으며, 희석 배수가 커질수록 discrepancy가 커지는 경향성을 보였다. Linearity equation의 기울기는 DNMT3A R882, ASXL1 G646fs\*12, NPM1 W288fs\*12를 제외하면 0.75~1.3의 분포였으며, R<sup>2</sup>값 또한 0.95 이상인 경우가 대부분이었다.

ASXL1 G646fs\*12의 경우, 원액의 기대 VAF는 40.00%였으나, 측정 VAF는 18.65%로 discrepancy는 -53.38%였다. 단계희석에서도 이와 같은 경향성은 그대로 유지되어 y=0.4391x+0.8642 (R<sup>2</sup>=0.9846)를 나타냈다. 다만, 1:8 희석액은 기대 VAF는 2.5%였으나, 측정 VAF는 2.87%로 discrepancy는 -14.80%였다.

DNMT3A R882C의 경우, 원액의 기대 VAF는 5%였으나, 측정 VAF는 2.42%로 discrepancy는 -51.60%였다. 또한 1:1 희석액에서도 기대 VAF는 2.50%였으나, 측정 VAF는 1.05%로 discrepancy는 -58.00%였다. 그러나 그 이후 단계희석에서는 discrepancy가 1:2, 1:4, 1:8에서 각각 14.40%, 2.40%, -32.80%로 기대값이 낮은 것에 비해 측정값과의 차이는 크지 않았다.

**Table 1.** Expected and measured VAFs of 21 variants in different dilution ratios using amplicon-based next-generation sequencing

Variants	Dilution ratio (%)					Equation	R <sup>2</sup>
	Undiluted	1:1	1:2	1:4	1:8		
<i>ABL1</i> T315I						$y=1.3059x-0.3469$	0.9445
Expected VAF	5.00	2.50	1.25	0.63	0.31		
Measured VAF	6.61	2.20	0.70	0.80	0.61		
Discrepancy*	32.27	-12.05	-44.24	28.31	93.66		
<i>ASXL1</i> W796C						$y=1.0839x-0.0400$	0.9948
Expected VAF	5.00	2.50	1.25	0.63	0.31		
Measured VAF	5.45	2.58	1.11	0.82	0.34		
Discrepancy	9.00	3.20	-11.20	31.20	8.80		
<i>CBL</i> S403F						$y=0.7530x+0.2850$	0.9919
Expected VAF	5.00	2.50	1.25	0.63	0.31		
Measured VAF	4.02	2.30	1.11	0.63	0.66		
Discrepancy	-19.60	-8.00	-11.20	0.80	111.20		
<i>DNMT3A</i> R882C						$y=0.4017x-0.3717$	0.8243
Expected VAF	5.00	2.50	1.25	0.63	0.31		
Measured VAF	2.42	1.05	1.43	0.64	0.21		
Discrepancy	-51.60	-58.00	14.40	2.40	-32.80		
<i>EZH2</i> R418Q						$y=1.0351x+0.1804$	0.9545
Expected VAF	5.00	2.50	1.25	0.63	0.31		
Measured VAF	5.64	2.02	1.77	0.92	0.58		
Discrepancy	12.80	-19.20	41.60	47.20	85.60		
<i>FLT3</i> D835Y						$y=0.9507x-0.0779$	0.9873
Expected VAF	5.00	2.50	1.25	0.63	0.31		
Measured VAF	4.77	2.22	0.80	0.58	0.45		
Discrepancy	-4.60	-11.20	-36.00	-7.20	44.00		
<i>IDH1</i> R132C						$y=0.6163x+0.6779$	0.8493
Expected VAF	5.00	2.50	1.25	0.63	0.31		
Measured VAF	3.52	2.44	2.18	0.91	0.31		
Discrepancy	-29.60	-2.40	74.40	45.60	-0.80		
<i>IDH2</i> R172K						$y=1.2016x+0.3079$	0.9230
Expected VAF	5.00	2.50	1.25	0.63	0.31		
Measured VAF	5.89	4.45	1.31	0.98	0.55		
Discrepancy	17.80	78.00	4.80	56.80	76.00		
<i>JAK2</i> V617F						$y=0.9561x-0.0504$	0.9833
Expected VAF	5.00	2.50	1.25	0.63	0.31		
Measured VAF	4.58	2.57	1.43	0.33	0.10		
Discrepancy	-8.40	2.80	14.40	-47.20	-68.00		

(Continued on next page)

Table 1. Continued

Variants	Dilution ratio (%)					Equation	R <sup>2</sup>
	Undiluted	1:1	1:2	1:4	1:8		
<i>JAK2</i> F537-K539						$y=0.7071x-0.4121$	0.8533
Expected VAF	5.00	2.50	1.25	0.63	0.31		
Measured VAF	3.53	0.37	0.68	0.21	0.00		
Discrepancy	-29.40	-85.20	-45.60	-66.40	-100.00		
<i>NPM1</i> W288fs*12						$y=0.4414x+0.4988$	0.6824
Expected VAF	5.00	2.50	1.25	0.63	0.31		
Measured VAF	2.34	2.23	1.63	0.13	0.44		
Discrepancy	-53.20	-10.80	30.40	-79.20	40.80		
<i>SF3B1</i> G740E						$y=0.8877x+0.0521$	0.9967
Expected VAF	5.00	2.50	1.25	0.63	0.31		
Measured VAF	4.48	2.36	1.01	0.60	0.41		
Discrepancy	-10.40	-5.60	-19.20	-4.00	31.20		
<i>TET2</i> R1261H						$y=1.2071x-0.2808$	0.8669
Expected VAF	5.00	2.50	1.25	0.63	0.31		
Measured VAF	6.42	1.16	1.53	0.63	0.55		
Discrepancy	28.40	-53.60	22.40	0.80	76.00		
<i>TP53</i> S241F						$y=1.000x+0.4704$	0.9603
Expected VAF	5.00	2.50	1.25	0.63	0.31		
Measured VAF	5.38	2.92	2.39	0.80	0.55		
Discrepancy	7.60	16.80	91.20	28.00	76.00		
<i>NRAS</i> Q61L						$y=0.8621x+0.8854$	0.9116
Expected VAF	10.00	5.00	2.50	1.25	0.63		
Measured VAF	9.82	4.15	3.47	3.29	0.40		
Discrepancy	-1.80	-17.00	38.80	163.20	-36.00		
<i>GATA2</i> G200fs*18						$y=1.0731x+5.0021$	0.9729
Expected VAF	35.00	17.50	8.75	4.38	2.19		
Measured VAF	40.74	27.78	14.71	8.06	6.49		
Discrepancy	16.40	58.74	68.11	84.23	196.69		
<i>RUNX1</i> M267I						$y=1.043x-1.0113$	0.9801
Expected VAF	35.00	17.50	8.75	4.38	2.19		
Measured VAF	34.31	20.56	6.60	2.60	1.60		
Discrepancy	-1.97	17.49	-24.57	-40.57	-26.86		
<i>ASXL1</i> G646fs*12						$y=0.4391x+0.8642$	0.9846
Expected VAF	40.00	20.00	10.00	5.00	2.50		
Measured VAF	18.65	9.09	5.82	1.92	2.87		
Discrepancy	-53.38	-54.55	-41.80	-61.60	14.80		

(Continued on next page)

Table 1. Continued

Variants	Dilution ratio (%)					Equation	R <sup>2</sup>
	Undiluted	1:1	1:2	1:4	1:8		
<i>KRAS</i> G13D						$y=0.9612x+0.9617$	0.9944
Expected VAF	40.00	20.00	10.00	5.00	2.50		
Measured VAF	38.57	21.75	11.20	5.52	2.26		
Discrepancy	-3.58	8.75	12.00	10.40	-9.60		
<i>BCOR</i> Q1174fs*8						$y=0.9654x-0.6417$	0.9942
Expected VAF	70.00	35.00	17.50	8.75	4.38		
Measured VAF	68.06	30.21	17.88	6.69	4.89		
Discrepancy	-2.77	-13.69	2.17	-23.54	11.77		

Abbreviation: VAF, variant allele frequency.

\*Discrepancy: (measured VAF-expected VAF)/expected VAF×100.

*NPM1* W288fs\*12의 경우, 원액의 기대 VAF는 5.00%였으나, 측정 VAF는 2.34%로 discrepancy는 -53.20%였다. 그러나 단계희석액에서는 기대값과 측정값의 차이가 1:4 희석을 제외하고는 큰 차이가 없었다. 결과는 Table 1과 Supplement 1에 정리되어 있다.

## 고찰

본 연구는 *ASXL1* 코돈 646부위의 단일염기중합체 부위에서 PCR 오류로 인하여 인공산물이 발생할 수 있다는 가설을 상품화된 정도관리물질과 엠플리콘 방식의 차세대염기서열 기기를 이용하여 검증하고자 하였다.

분석대상이었던 21개의 변이는 원액에서 모두 검출되었다. 또한 정량적인 부분에 있어 *DNMT3A* R882, *ASXL1* G646fs\*12, *NPM1* W288fs\*12를 제외하면 모두 원액에서 기대값과 측정치가 큰 차이가 없었으며, 단계희석에서 좋은 상관관계를 나타냈다. 또한 *DNMT3A* R882C는 1:2 단계희석부터, *NPM1* W288fs\*12는 1:1 단계희석부터는 기대값과 측정값의 큰 차이가 없었으며, 좋은 상관관계를 나타냈다. 이 두 변이의 원액에서 특히 높은 discrepancy가 있었던 원인은 불분명하다. 기대 VAF가 5%인 항목들이 총 14개인데, 이들 두 항목에서만 높은 discrepancy를 보였으므로, 기대 VAF가 원인이었을 가능성은 높지 않다. 또한 단계희석 시에는 오히려 discrepancy가 크지 않았다. 이들 변이에 대해 반복 측정하여 평균값이나 중위값을 산출한다면 이와 같은 현상이 일회성인지를 파악하는 데에 도움이 될 수 있을 것으로 생각된다.

원액의 VAF가 10% 이상인 6개의 변이 중 *ASXL1* G646fs\*12를 제외하면, *GATA2* G200fs\*18만이 16.40%의 discrepancy를

보였다. 이는 본 연구에서 염기순서분석 라이브러리 제작에 사용되었던 패널과 차세대염기서열분석 기기의 성능이 우수함을 증명하며, 또한 각각 다른 변이비율을 얻기 위해 시행한 단계희석이 잘 되었음을 보여준다.

반면, *ASXL1* G646fs\*12 변이의 경우에는 1:8 희석을 제외하고 원액과 1:1, 1:2, 1:4 단계 모두에서 측정값이 기대값의 50%가량이었다. 다른 변이에 대한 위의 결과를 고려하면, 이는 이 패널 또는 차세대염기서열분석기가 이 변이에 대해서 특히 취약함을 증명한다. 원인은 명확치 않으나, Yannakou 등[5]이 제시한 바와 같이 amplicon 기반의 차세대염기서열분석에서 이 단일염기중합체 부위에서 일어났을 가능성이 높다. 그러나 기존 연구에서는 이 부위에서 반복적인 오류가 일어나 artifact, 즉 위양성이 발생할 가능성을 제시하였으나, 본 연구에서는 VAF가 기대값보다 약 50% 낮게 측정되어 위양성보다는 위음성 또는 낮은 VAF의 위험성이 있음을 시사하였다. 이와 같은 현상의 원인은 불분명하나, 시발체 (primer) 결합 시 오류 등이 원인이 되었을 수 있다.

연구의 한계점으로는 위에서도 언급된 바와 같이 본 연구에서 관찰된 결과가 일회성인지, 일반적인 결과인지를 확인하기 위한 반복검사가 시행되지 못했다는 점이다. 추후 연구에서 반복 측정하여 평균값이나 중위값을 산출하는 것이 결과의 일반화에 도움이 될 것이다. 또 하나의 한계점으로는 검체 희석에 사용한 혈액중량으로 진단받지 않은 환자의 gDNA에 대해 *ASXL1* G646fs\*12는 직접염기순서분석법으로 확인하였으나, 그 외의 변이를 미리 확인하지 못한 점을 들 수 있다. 평가한 변이들 중 *TET2*, *DNMT3A*를 포함한 몇 유전자의 변이가 노화에 따른 클론성 조혈증과 관련이 있어, 희석에 사용한 gDNA의 상태가 결과에 영향을 끼쳤을 가능성을 완전히 배제할 수 없다[8].

본 연구에서는 희석을 통한 다양한 농도의 상품화된 정도관리

물질을 이용하여 특정 패널과 기기를 이용한 차세대염기서열분석법의 경우 ASXL1 G646fs\*12 변이가 실제에 비해 낮은 변이비율로 보고될 가능성을 제시하였다. 이 오류가 특정 패널 또는 기기에 국한된 것인지를 확인하기 위해서는 추후 연구에서 다른 방식의 패널과 기기를 이용하여 검증하는 것이 필요하다고 생각된다.

## 감사의 글

이 연구는 대한임상검사정도관리협회의 2020년도 학술연구과제 연구비 지원으로 수행되었다(과제번호: 2020-11).

## ORCID

Miyoung Kim	<a href="https://orcid.org/0000-0002-8903-5044">https://orcid.org/0000-0002-8903-5044</a>
Nan Young Kim	<a href="https://orcid.org/0000-0001-9245-8657">https://orcid.org/0000-0001-9245-8657</a>
Sangkyoon Hong	<a href="https://orcid.org/0000-0003-4487-5872">https://orcid.org/0000-0003-4487-5872</a>
Jiwon Lee	<a href="https://orcid.org/0000-0002-9232-9342">https://orcid.org/0000-0002-9232-9342</a>
Yonggeun Cho	<a href="https://orcid.org/0000-0003-1946-4318">https://orcid.org/0000-0003-1946-4318</a>
Han-Sung Kim	<a href="https://orcid.org/0000-0002-5481-5390">https://orcid.org/0000-0002-5481-5390</a>
Hee Jung Kang	<a href="https://orcid.org/0000-0003-1249-6181">https://orcid.org/0000-0003-1249-6181</a>
Young Kyung Lee	<a href="https://orcid.org/0000-0003-0433-8028">https://orcid.org/0000-0003-0433-8028</a>

## SUPPLEMENTARY MATERIALS

Supplementary materials can be found via <https://doi.org/10.15263/jlmqa.2022.44.2.76>

## REFERENCES

- Gelsi-Boyer V, Brecqueville M, Devillier R, Murati A, Mozziconacci MJ, Birnbaum D. Mutations in ASXL1 are associated with poor prognosis across the spectrum of malignant myeloid diseases. *J Hematol Oncol* 2012;5:12.
- Uni M, Masamoto Y, Sato T, Kamikubo Y, Arai S, Hara E, et al. Modeling ASXL1 mutation revealed impaired hematopoiesis caused by derepression of p16Ink4a through aberrant PRC1-mediated histone modification. *Leukemia* 2019;33:191-204.
- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2017.
- Abdel-Wahab O, Kilpivaara O, Patel J, Busque L, Levine RL. The most commonly reported variant in ASXL1 (c.1934dupG;p.Gly646TrpfsX12) is not a somatic alteration. *Leukemia* 2010;24:1656-7.
- Yannakou CK, Jones K, McBean M, Thompson ER, Ryland GL, Doig K, et al. ASXL1 c.1934dup;p.Gly646Trpfs\*12: a true somatic alteration requiring a new approach. *Blood Cancer J* 2017;7:656.
- Alberti MO, Srivatsan SN, Shao J, McNulty SN, Chang GS, Miller CA, et al. Discriminating a common somatic ASXL1 mutation (c.1934dup; p.G646Wfs\*12) from artifact in myeloid malignancies using NGS. *Leukemia* 2018;32:1874-8.
- Schnittger S, Eder C, Fasan A, Illig T, Klopp N, Wichmann HE, et al. Somatic mutations and inborn variants in exon 12 of ASXL1 in different myeloid neoplasms. *Blood* 2011;118:1394.
- Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med* 2014;371:2488-98.