**Methodik Details:**

Im Rahmen dieser Analyse wird eine NGS Analyse mittels Short-Read-Sequencing Technologie durchgeführt, welche zur Detektion von DNS-Veränderungen in bestimmten genomischen Bereichen genutzt wird. Zur Anreicherung, der Zielregionen wird ein sondenbasiertes Hybridiersungsverfahren genutzt (AGILENT SureSelect Enzymatic Fragmentation Kit und SureSelect XT HS Target Enrichment revA, GIN\_DNA\_v1 Panel – Details siehe https://github.com/Neuropathology-Giessen/GIN-DNA-Panel-Details), welches mittels eines Pipettierroboters (AGILENT Magnis NGS Prep System) ausgeführt wird. Die Library QC erfolgt mittels Tapestation D1000 Screentape (Agilent). Die anschließende Analyse wird auf einer Illumina MiSeq Platform durchgeführt.

Die Auswertung erfolgt mittels einer in-house Pipeline (GIN\_somatic 0.6) basierend auf BWA in Abgleich mit dem humanen Referenzgenom (GRCh37/hg19) und GATK 4.2.4.0 (https://gatk.broadinstitute.org). Reads, welche mittels picard MarkDuplicates als PCR Duplikate identifiziert wurden, werden aussortiert. Die Rekalibrierung der Nukleotid-Mapping-Qualität erfolgte mittels GATK BaseRecalibrator und dbSNP (fileDate=20180419). Die Variantenbestimmung erfolgt mit Hilfe von GATK MUTECT2. Hierbei wurde die von GATK präparierte gnomAD Datenbank als Filter für Keimbahnmutation hinzugezogen (Zeitstempel 05.09.2018, 14:25:36). Zur Bestimmung möglicher Kreuz-Kontaminationen mit GATK CalculateContamination, werden die Reads mittels GATK GetPileupSummaries gezählt und gegen gewöhnliche Keimbahnvarianten aus gnomAD R2.1 abgeglichen. Anschließend erfolgt ein Filterschritt, bei welchem auch mögliche Artefakte aus falsch orientierten Reads einbezogen werden, welche bei GATK LearnReadOrientationModel identifiziert wurden.

Zur Interpretation der detektierten Varianten mittels GATK Funcotator werden die Datenquellen achilles, cancer\_gene\_census, clinvar, cosmic, cosmic\_fusion, cosmic\_tissue, dbSNP, dna\_repair\_genes, familial, gencode, gencode\_xhgnc, gencode\_xrefseq, gnomAD, hgnc, oregano and UniProt aus Version 1.6.20190124s hinzugezogen.

Weiterhin werden Hotspot-Varianten des TERT-Promotors berichtet, sofern vorhanden.

Insertionen, Deletionen, Duplikationen, sowie Varianten mit einer Allelfrequenz < 5% werden in der Standardanalyse nicht erfasst. Varianten innerhalb des mitochondriellen Genoms werden, sofern nicht anders angegeben, nicht analysiert. In Einzelfällen können zufällige Homologien, Repeat-Expansionen, Homopolymere, Paraloge, Pseudogene oder Fehlalignments zu falsch-positiven bzw. falsch-negativen Ergebnissen führen.