

PUBLICATIONS INCLUDED IN THESIS

Lennart Raman, et al. WisecondorX: improved copy number detection for routine shallow whole genome sequencing. *Nucleic Acids Research*. 2019

Lennart Raman, et al. PREFACE: *in silico* pipeline for accurate cell-free fetal DNA fraction prediction. *Prenatal Diagnosis*. 2019

Malaïka Van der Linden*, Lennart Raman*, et al. Detection of copy number alterations by shallow whole-genome sequencing of formalin-fixed paraffin-embedded tumor tissue. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2019

Lennart Raman*, Malaïka Van der Linden*, Kim Van der Eecken*, et al. Shallow whole-genome sequencing of plasma cell-free DNA accurately differentiates small from non-small cell lung carcinoma. *Genome Medicine*. 2020

Lennart Raman*, Malaïka Van der Linden*, Ciel De Vriendt*, et al. Shallow-depth sequencing of cell-free DNA for Hodgkin and diffuse large B-cell lymphoma (differential) diagnosis: a standardized approach with underappreciated potential. *Haematologica*. 2020

Andries De Koker*, Lennart Raman*, et al. A versatile method for circulating cell-free DNA methylome profiling by reduced representation bisulfite sequencing. *To be submitted*. 2021

*contributed equally

MEMBERS OF THE EXAMINATION COMMITTEE

Prof. Dr. Patrick Calders – chairman
Department of Rehabilitation Sciences and Physiotherapy, Ghent University, Ghent

Prof. Dr. Katrien Devreese – secretary
Department of Diagnostic Sciences, Ghent University, Ghent

Prof. Dr. Bram De Wilde
Department of Pediatric Hematology, Ghent University, Ghent

Prof. Diether Lambrechts
Department of Human Genetics, Catholic University of Leuven, Leuven

Prof. Kathleen Marchal
Department of Information Technology, Ghent University, Ghent

Dr. Dieter Peeters
Department of Pathology, AZ Sint-Maarten, Mechelen

Dr. Tom Sante
Department of Biomolecular Medicine, Ghent University, Ghent

COPY NUMBER AND METHYLATION PROFILING OF CELL-FREE DNA FOR TUMOR AND PRENATAL DIAGNOSTICS

A MULTI-COHORT RESEARCH EFFORT

Lennart Raman

Promoter: Prof. Dr. Jo Van Dorpe
Co-promoter: Prof. Björn Menten

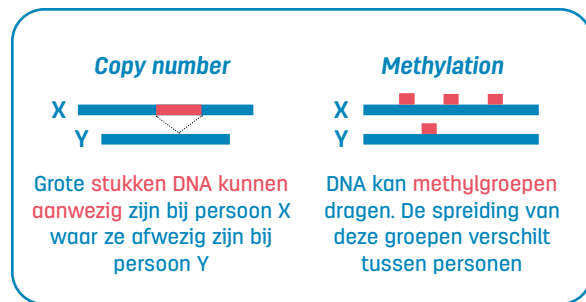
Public PhD defense to obtain the degree of 'Doctor in Health Sciences'
June 21, 2021

 FACULTY OF MEDICINE AND HEALTH SCIENCES


GHENT UNIVERSITY

ACHTERGROND

Elk individu bezit een genetische identiteit, het genoom, opgebouwd uit vier moleculaire elementen die samen DNA-sequenties vormen. Hoewel het genoom zeer constant is binnen onze soort, vertoont het toch verschillen tussen individuen. Deze variaties maken ieder van ons uniek. Gedurende mijn doctoraat hebben we vooral variaties in *copy number* en *methylation* onderzocht.



DNA-varianties kunnen aanleiding geven tot verscheidene aangeboren ziekten. Bovendien verwerft iedereen extra variaties (mutaties) gedurende zijn leven, die er mogelijk voor zorgen dat cellen niet langer gecontroleerd delen, met tumorgroei tot gevolg.

Vandaag worden kankerdiagnoses steeds meer gesteld op moleculair niveau, wat veelal de accuraatheid ten goede komt. Deze evolutie wordt evenwel bemoeilijkt door de nood aan tumorcellen die de vereiste informatie (waaronder DNA) bevatten. De invasieve procedures om deze cellen te isoleren zijn onderhevig aan risico's, en de uitvoering ervan is daarenboven niet altijd mogelijk bij verzwakte patiënten.

Nog niet zo lang geleden werd ontdekt dat ook humaan bloed DNA bevat. Cellen zijn dynamisch en

worden constant vernieuwd. Wanneer ze sterven, lossen ze hun celinhoud in de bloedcirculatie. Het vrijgegeven DNA wordt *cell-free DNA* genoemd.

Het bekendste product van deze recente onderzoeken is ongetwijfeld de niet-invasieve prenatale test. Deze test staat toe om op een risicoloze manier bepaalde foetale afwijkingen te detecteren na 12 weken zwangerschap, gezien er zich ook foetaal DNA in matернаal bloed van zwangere vrouwen bevindt.

Bij kankerpatiënten kent een deel van het *cell-free DNA* een tumorale oorsprong. Een correcte diagnose zou dus gesteld kunnen worden op basis van een *liquid biopsy* – een klassiek bloedstaal. *Liquid biopsies* worden echter nog niet gebruikt in de routine kankerdiagnostiek. Er is namelijk nog veel onderzoek nodig naar het potentieel van *cell-free DNA*. In mijn thesis onderzoeken we hoe de detectie van *copy number* en *methylation*-varianties in *cell-free DNA* kan bijdragen tot het diagnostiseren van longkanker en lymfomen. Verder hebben we gepoogd de routine niet-invasieve test te verbeteren aan de hand van biostatistische optimalisaties.

RESULTS

- (1) In order to accurately derive copy number state from shallow whole-genome sequencing data, we developed the **WisecondorX** software. In comparison to most alternatives, WisecondorX is not limited to non-invasive prenatal testing data, but also runs liquid biopsies, preimplantation embryos, formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples, etc.
- (2) To predict the fetal cell-free DNA fraction during non-invasive prenatal testing, we developed **PREFACE**. Its machine learning algorithm circum-

vents the need (and cost) for additional experimental assays. By allowing individual centers to train their own optimized models, between-laboratory train/test bias is omitted.

- (3) Next, we optimized and statistically validated a shallow whole-genome sequencing-based **formalin-fixed paraffin-embedded** copy number detection protocol to verify whether liquid biopsy-derived copy number alterations represent their solid origin.
- (4) Our first proof-of-concept study investigated liquid biopsy-derived copy number alterations for their subtyping potential in advanced-stage **lung cancer** patients. Most notably, we show that distinguishing small from non-small cell lung carcinoma is feasible at 98% accuracy.
- (5) Our second proof-of-concept study investigated **Hodgkin** and **aggressive B-cell non-Hodgkin lymphoma** patients. Roughly 80% of liquid biopsies expressed tumoral copy number alterations at diagnosis; and, all Epstein-Barr virus-positive patients had a significantly elevated number of plasmatic viral DNA fragments, achieving a sensitivity of 100% compared to current standard. We also demonstrate that our approach allows an accurate differential diagnosis between Hodgkin and diffuse large B-cell lymphoma.
- (6) Finally, **methylation profiles** of lung cancer liquid biopsies were evaluated. We illustrate how lung cancer can be histologically classified at near-100% specificity based on ~500 CpG islands. The specificity of these islands was further emphasized by testing patients with other lung-related diseases, including organizing pneumonia, amyloidosis, vasculitis, silicosis and pleuritis.