

Molecular signatures and prognosis of HPV-positive head and neck lesions

Citation for published version (APA):

Mooren, J. J. (2014). *Molecular signatures and prognosis of HPV-positive head and neck lesions*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20141116jm>

Document status and date:

Published: 01/01/2014

DOI:

[10.26481/dis.20141116jm](https://doi.org/10.26481/dis.20141116jm)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

In **chapter 1** a general introduction is provided, in which head and neck carcinogenesis, its epidemiology and the role of oncogenic HPV-infection in oropharyngeal squamous cell carcinoma (OPSCC), is reviewed. Particularly, the incidence of HPV-positive OPSCC has increased significantly worldwide over the last decades. In this context the influence of different HPV detection methods on supposed incidence rates is discussed. An overview of HPV-subtypes and HPV-induced carcinogenesis is provided, including the process in which viral oncoproteins affect essential cellular processes, such as the cell cycle and apoptosis. By this means, it becomes obvious that HPV-positive OPSCC have to be regarded a separate tumour entity with differing molecular and clinical characteristics. The aims and outline of the present thesis are described in the end of the chapter.

Because the cyclin dependent kinase inhibitor p16^{INK4A} is active in HPV-positive OPSCC, but often deleted or inactivated in HPV-negative tumours, it is of great scientific and clinical interest to see whether or not immunohistochemical p16^{INK4A} staining is a reliable surrogate marker for the presence of both low-risk (LR) and high-risk (HR)-HPV in benign and (pre)malignant head and neck lesions. Therefore, in **chapter 2**, p16^{INK4A} immunohistochemistry was performed on paraffin-embedded tissue sections of 162 OPSCC, 14 tonsillar and 23 laryngeal dysplasias, and 20 tonsillar and 27 laryngeal papillomas, and correlated to HPV-status. PCR, enzyme-immunoassay and FISH analyses were used to assess HPV-presence and type. P16^{INK4A} immunostaining patterns were first scored on a semiquantative scale: score 0 (<5% of cells being p16^{INK4A} positive) to score 3 (>25% positive cells). In addition, p16^{INK4A} staining patterns were scored according to the 'block-type' immunopositivity approach, defined as p16^{INK4A} being block positive if continuous (>70%) strong nuclear with or without cytoplasmic staining is present (in all head and neck lesions) and staining is observed in the basal cell layer with extension upwards (in the benign and premalignant lesions). Thirty-one percent of OPSCC and 71% of tonsillar dysplasias were HPV16-positive. Sixteen percent of the laryngeal dysplasias and 96% of the laryngeal papillomas were positive for HPV6 or -11 and surprisingly all tonsillar papillomas were HPV-negative. We hypothesize that this HPV-negativity is caused by elimination of the virus by the immune system with persistence of the lesions, or by the fact that other viruses, yet to be discovered, play an etiological role in the development of the tonsillar papillomas. P16^{INK4A} immunohistochemistry revealed a strong (score 3) and block-positive nuclear and cytoplasmic staining in 50 out of 51 HPV16-positive and 5 out of 111 HPV-negative OPSCC, resulting in a highly significant correlation with HPV-positivity. All HPV16-positive tonsillar dysplasia samples

also showed a strong (score 3) p16^{INK4A} expression, 8 of these being block-positive. In contrast, highly variable staining patterns were detected in the papillomas and laryngeal dysplasias, irrespective of HPV-status. These results indicate that a strong nuclear and cytoplasmic p16^{INK4A} immunostaining pattern can indeed accurately predict the presence of HR-HPV16 in OPSCC and tonsillar dysplasias, with a proposed cut-off level of 70% p16^{INK4A} positive cells. In the other premalignant and benign head and neck lesions, however, caution is recommended when using this surrogate marker for HPV-infection.

Literature has shown that the HPV-oncogenes E6 and E7 inactivate p53 and pRb, respectively, leading to disruption of cell cycle regulation and of the apoptotic pathway. **Chapter 3** evaluates the expression and the prognostic value of key cell cycle proteins in the pRb and p53 pathways in both HPV16-positive and -negative tonsillar squamous cell carcinoma (TSCC). Using immunohistochemistry, 77 TSCC with known HPV16-status (previously determined by HPV-specific PCR and FISH) and clinical outcome were analyzed for expression of proteins in the pRb pathway (p16^{INK4A}, cyclin D1, p27^{Kip1} and pRb) and the p53 cascade (p14^{ARF}, MDM2, p53 and p21^{Cip1/WAF1}). Results were correlated with each other, with other risk factors like alcohol consumption and smoking, and with clinical and demographic patient data. Thirty-five percent of TSCC harboured integrated HPV16 and showed p16^{INK4A} overexpression. These tumours also exhibited overexpression of p14^{ARF} and p21^{Cip1/WAF1}, as well as downregulation of pRb and cyclin D1 and tended to be smaller as compared to the HPV-negative cases. Smoking and alcohol abuse were seen significantly more often in the HPV-negative patient group and there was a tendency towards more frequent accumulation of p53 in these tumours. HPV-positive tumours had a significant, favourable survival compared to the HPV-negative cases. The 5 years disease-specific survival was 31% for patients with an HPV-negative tumour and 69% for patients with an HPV-positive carcinoma. In multivariate regression analyses, smaller tumour size and strong p21^{Cip1/WAF1} immunostaining appeared to be the most significant independent indicators for favourable prognosis in TSCC patients. These data indicate that the carcinogenesis in HPV-associated TSCC is different than that in tumours induced by smoking and/or alcohol consumption.

Results in previous studies have led to the hypothesis that at least two genetic routes underlie the development of OPSCC, as the development of smoking/alcohol induced OPSCC appears to occur via accumulation of distinct (epi)genetic changes than HPV-induced tumours. In **chapter 4** DNA copy number changes have been analyzed by genome-wide comparative genomic hybridization (CGH) in a series of 60 OPSCC, of which HPV-status and clinical data were available. Results have been correlated with HPV-status, clinico-

pathological characteristics, smoking and alcohol intake and disease outcome. HPV16-positivity was determined by means of HPV-specific PCR and FISH analysis and positive p16^{INK4A} immunostaining. Forty-nine percent of the tumours contained HPV16 and showed p16^{INK4A} overexpression. Two thirds of all OPSCC harboured gain at 3q26.3-qter irrespective of HPV-status. In HPV-negative tumours this alteration was associated with advanced tumour stage. In comparison with HPV-positive OPSCC, the HPV-negative tumours harboured a higher number of chromosomal alterations and amplifications, as well as significantly more losses at 3p, 5q, 9p, 15q and 18q and gains/amplifications at 11q13, and, finally, less often 16q losses and Xp gains. Survival analysis revealed a significantly better 5 year disease-free survival for HPV-positive OPSCC compared to HPV-negative cases (71% versus 46%, respectively), whereas chromosome amplification was an unfavourable prognostic indicator. Interestingly, 16q loss, predominantly identified in HPV-positive OPSCC, was a strong indicator of favourable outcome and none of these patients had a tumour recurrence. These results indicate that HPV-positive and -negative OPSCC show different genetic signatures and most likely underlie differences in tumour development and progression. In addition, distinct chromosomal alterations have prognostic significance.

Chapter 5 describes the presence of chromosome instability in a series of primary TSCC in correlation to HPV16-status and patient survival. Previous data from cellular model systems are controversial concerning this relation. Furthermore, we were able to select 8 additional HPV-positive tonsillar dysplasias, 7 of which were found adjacent to a TSCC, for comparison of chromosomal (in)stability and the physical status of HPV. Seventy-seven TSCC, with known HPV16-status and clinical outcome, were analyzed by FISH, using chromosome 1- and 7-specific centromere DNA probes, to detect chromosome instability. Forty-two percent of tumours showed HPV16-integration and p16^{INK4A} overexpression. Disomy for chromosome 1 and 7 was significantly more often observed in HPV-positive TSCC compared to the HPV-negative cases (19 out of 32 tumours versus 10 out of 45 tumours, respectively). Aneusomy correlated significantly with HPV-negative TSCC, tobacco- and alcohol consumption and a higher T-stage. Strong p53 immunostaining was also associated with HPV-negative tumours and smoking and/or alcohol abuse, but not with aneusomy and T-stage. In the dysplasias an identical HPV and chromosome copy number status was identified as in the adjacent tumours. The disease specific survival after 5 years was significantly better for patients with an HPV-positive carcinoma compared to the HPV-negative TSCC group (30% versus 74%, respectively). Chromosome instability was a significant indicator for unfavourable prognosis in the total

TSCC group, but was an even stronger unfavourable prognosticator in the HPV-positive patient group.

Chapter 6 outlines the incidence and predictive value of HPV-presence and EGFR expression in a series of advanced OPSCC (n=111) and hypopharyngeal squamous cell carcinomas (HPSCC, n=46), all treated with concurrent radiotherapy and chemotherapy (cisplatin). Previous studies that analyzed EGFR expression in relation to survival in head and neck carcinomas observed different outcomes. In the present study HPV-positivity was determined by means of HPV16-specific FISH-analysis in all tumour sections and HPV-specific PCR in 10 cases. Tissue microarrays of tumour specimens were subjected to p16^{INK4A} and EGFR immunohistochemistry. Thirty-seven out of 111 (33%) OPSCC showed strong p16^{INK4A} immunostaining in more than 70% of tumour cells. Thirty-five of these 37 cases contained HPV16 assessed by FISH analysis. The 2 p16^{INK4A} positive, HPV16 FISH-negative cases proved to contain HPV33 DNA upon PCR analyses. The HPV-positive OPSCC group showed a significantly higher male-female ratio and these patients were less often cigarette smokers than patients with an HPV-negative tumour. 73% of HPV-positive OPSCC were also EGFR positive compared to 64% EGFR positive cases in the HPV-negative group (no significant difference). HPV-positivity was associated with the occurrence of less locoregional recurrences, less distant metastases and a more favourable overall and disease free survival. No associations were found between EGFR expression and survival in the whole OPSCC group and in the HPV-negative group. Within the HPV-positive group, however, EGFR immunopositive tumours had a significantly worse survival than EGFR negative cases. Furthermore, 9 out of 31 smokers developed recurrent diseases versus 1 out of 6 non-smokers, but this difference was not significant. Only 1 HPSCC (2%) was both p16^{INK4A} and HPV-positive. In addition to previous studies described in this thesis, the present study makes it more evident that HPV-positive tumours are not a homogenous group and do not all have a favourable treatment outcome.

Chapter 7 comprises the general discussion and the conclusion of the results described in this thesis. Moreover, findings are related to recent literature and future perspectives are discussed.

Samenvatting

Hoofdstuk 1 geeft een algemene inleiding met een overzicht van de carcinogenese van hoofd-hals kanker, de epidemiologie en de rol van oncogene HPV-infectie in de ontwikkeling van het plaveiselcelcarcinoom van de orofarynx (OPSCC). Met name de incidentie van HPV-positieve OPSCC is in de afgelopen decennia wereldwijd aanzienlijk toegenomen. In dit licht wordt de invloed van verschillende HPV-detectiemethoden op veronderstelde incidentiecijfers besproken. Er wordt een overzicht gegeven van de HPV-subtypes en HPV-geïnduceerde carcinogenese, inclusief het mechanisme waarmee virale oncoproteïnen essentiële cellulaire processen, zoals de celcyclus en apoptose, beïnvloeden. Hiermee wordt duidelijk dat HPV-positieve OPSCC beschouwd kunnen worden als een aparte tumor entiteit met verschillende moleculaire en klinische kenmerken. Tenslotte worden de doelen en de opzet van dit proefschrift beschreven.

Omdat de cycline afhankelijke kinase remmer p16^{INK4A} actief is in HPV-positieve OPSCC, terwijl er vaak deletie of inactivatie plaatsvindt in HPV-negatieve tumoren, is het van groot wetenschappelijk en klinisch belang om te bepalen of immunohistochemische kleuring van p16^{INK4A} een betrouwbare surrogaat marker is voor de aanwezigheid van zowel laag-risico (LR) als hoog-risico (HR)-HPV in goedaardige en (pre)maligne hoofd-hals laesies. Daarom is in **hoofdstuk 2** p16^{INK4A} immunohistochemie uitgevoerd op paraffine-gebedde weefsel coupes van 162 OPSCC, 14 tonsil- en 23 larynx dysplasieën en 20 tonsil- en 27 larynx papillomen, en is dit gecorreleerd aan de HPV-status. PCR, enzym-immunoassay en FISH analyses werden gebruikt om de aanwezigheid van HPV en het HPV-type te bepalen. P16^{INK4A} immunokleuringspatronen werden eerst gescoord op een semikwantitatieve schaal: score 0 (<5% van de cellen p16^{INK4A} positief) tot score 3 (>25% positieve cellen). Daarnaast werden de p16^{INK4A} kleuringspatronen gescoord volgens het principe van 'bloktype' immunopositiviteit, gedefinieerd als een blok-positieve p16^{INK4A} kleuring wanneer er continue (>70%) sterke nucleaire - met of zonder cytoplasmatische aankleuring - aanwezig is (in het geval van alle hoofd-hals laesies) en wanneer er kleuring wordt waargenomen in de basale cellaag met uitbreiding naar boven (in het geval van goedaardige en premaligne laesies). Eenendertig procent van de OPSCC en 71% van de tonsil dysplasieën waren HPV16-positief. Zestien procent van de larynx dysplasieën en 96% van de larynx papillomen waren positief voor HPV6 of -11. Opvallend was dat alle tonsil papillomen HPV-negatief waren. Een mogelijke verklaring voor deze HPV-negativiteit is de eliminatie van het virus door het immuunsysteem met persisteren van de laesie of doordat andere, nog nader te bepalen, virussen een etiologische rol spelen in de ontwikkeling van de tonsil papillomen.

P16^{INK4A} immunohistochemie toonde een sterke (score 3) en blok-positieve nucleaire en cytoplasmatische kleuring in 50 van de 51 HPV16-positieve en 5 van de 111 HPV-negatieve OPSCC, resulterend in een zeer significante correlatie met HPV-positiviteit. Alle HPV16-positieve tonsil dysplasieën toonden ook een sterke (score 3) p16^{INK4A} expressie en 8 van deze waren ook blok-positief. Daarentegen werden zeer variabele kleuringpatronen gezien in de papillomen en larynx dysplasieën, ongeacht de HPV-status. Deze resultaten tonen aan dat een sterke nucleaire en cytoplasmatische p16^{INK4A} immunokleuring inderdaad nauwkeurig de aanwezigheid van HR-HPV16 in OPSCC en tonsil dysplasieën kan voorspellen, met een voorgestelde afkapwaarde van 70% p16^{INK4A} positieve cellen. In de overige premaligne en goedaardige hoofd-hals laesies is voorzichtigheid geboden bij gebruik van deze surrogaat marker voor HPV-infectie.

De literatuur heeft aangetoond dat de HPV-oncogenen E6 en E7 zorgen voor inactivatie van p53 en pRb, resulterend in een verstoring van de celcyclus en de apoptose pathway. **Hoofdstuk 3** onderzoekt de expressie en de prognostische waarde van de belangrijkste celcyclus eiwitten in de pRb en p53 pathways in zowel HPV16-positieve als -negatieve tonsillaire plaveiselcelcarcinomen (TSCC). Met behulp van immunohistochemie werd in 77 TSCC, met bekende HPV16-status (eerder bepaald door middel van HPV-specifieke PCR en FISH) en klinische uitkomstmaten, de expressie van eiwitten in de pRb pathway (p16^{INK4A}, cycline D1, p27^{Kip1} en pRb) en de p53 cascade (p14^{ARF}, MDM2, p53 en p21^{Cip1/WAF1}) geanalyseerd. De resultaten werden gecorreleerd met elkaar, met risicofactoren zoals alcohol en roken en klinische en demografische patiëntgegevens. Vijfendertig procent van de TSCC had geïntegreerd HPV16 en toonde tevens p16^{INK4A} overexpressie. Deze tumoren lieten ook overexpressie van p14^{ARF} en p21^{Cip1/WAF1} en downregulatie van pRb en cycline D1 zien en er was een tendens tot kleinere tumorafmetingen in vergelijking met de HPV-negatieve gevallen. Roken en alcoholmisbruik werden significant vaker gezien in de HPV-negatieve patiëntengroep en er was een tendens naar frequentere accumulatie van p53 in deze tumoren. HPV-positieve tumoren hadden een significant gunstigere overleving in vergelijking tot de HPV-negatieve gevallen. De ziektespecifieke overleving na 5 jaar was 31% voor patiënten met een HPV-negatieve tumor en 69% voor patiënten met HPV-positieve carcinomen. Uit multivariate regressie analyse bleek dat kleinere tumorgrootte en sterke p21^{Cip1/WAF1} immunokleuring de belangrijkste onafhankelijke indicatoren waren voor een gunstige prognose in TSCC patiënten. Deze gegevens laten zien dat de carcinogenese bij HPV-geassocieerde TSCC anders is dan in door roken en/of alcohol geïnduceerde tumoren.

Resultaten uit eerdere studies hebben geleid tot de hypothese dat tenminste twee genetische routes ten grondslag liggen aan de ontwikkeling van OPSCC, omdat de ontwikkeling van roken en/of alcohol geïnduceerde OPSCC lijkt op te treden via accumulatie van andere (epi)genetische veranderingen dan die van HPV-geïnduceerde tumoren. In **hoofdstuk 4** werden veranderingen in DNA kopie aantallen geanalyseerd door genoombrede comparative genomic hybridization (CGH) in een reeks van 60 OPSCC, waarvan de HPV-status en klinische gegevens al beschikbaar waren. De resultaten zijn gecorreleerd met HPV-status, clinicopathologische kenmerken, roken en alcoholgebruik en met ziekte uitkomst. HPV16-positiviteit werd bepaald door middel van HPV-specifieke PCR en FISH analyse en positieve p16^{INK4A} immunokleuring. Negenenveertig procent van de tumoren bevatte HPV16 en toonde p16^{INK4A} overexpressie. Tweederde van alle OPSCC liet winst zien van 326.3-qter ongeacht de HPV-status. In HPV-negatieve tumoren was deze verandering geassocieerd met een verder gevorderd tumor stadium. In vergelijking tot HPV-positieve OPSCC hadden HPV-negatieve tumoren een groter aantal chromosomale afwijkingen en amplificaties, alsmede significant vaker verlies van 3p, 5q, 9p, 15q en 18q en winst/ amplificaties van 11q13 en ten slotte minder vaak 16q verlies en Xp winst. Overlevingsanalyse toonde een significant betere 5-jaars ziektevrije overleving voor HPV-positieve OPSCC in vergelijking tot HPV-negatieve gevallen (respectievelijk 71% versus 46%), terwijl chromosomale amplificatie een ongunstige prognostische factor was. Interessant was de observatie dat 16q verlies, voornamelijk gevonden in HPV-positieve OPSCC, een sterke indicator voor een gunstige prognose was en dat geen van deze patiënten een tumorrecidief had. Deze resultaten laten zien dat HPV-positieve en -negatieve OPSCC verschillende genetische kenmerken hebben die waarschijnlijk ten grondslag liggen aan verschillen in tumor ontwikkeling en progressie. Bovendien hebben verschillende chromosomale afwijkingen prognostische betekenis.

In **hoofdstuk 5** wordt de aanwezigheid van chromosomale instabiliteit in een serie primaire TSCC gecorreleerd met HPV16-status en patiëntenoverleving. Voorgaande data uit cellulaire modelsystemen zijn tegenstrijdig wat deze relatie betreft. Tevens zijn we in staat geweest om 8 extra HPV-positieve tonsil dysplasieën te selecteren, waarvan 7 werden gevonden naast een TSCC, voor een vergelijking van chromosomale (in)stabiliteit en de fysieke toestand van HPV. Zevenenzeventig TSCC, met bekende HPV16-status en klinische uitkomsten, werden geanalyseerd door middel van FISH met behulp van chromosoom 1- en 7-specifieke centromeer DNA-probes om chromosomale instabiliteit te detecteren. Tweeënveertig procent van de tumoren toonde HPV16-integratie en p16^{INK4A} overexpressie. Disomie voor chromosoom 1 en 7 werd significant vaker gezien in HPV-positieve TSCC in vergelijking tot de

HPV-negatieve gevallen (respectievelijk 19 van de 32 versus 10 van de 45 tumoren). Aneusomie was significant gecorreleerd met HPV-negatieve TSCC, tabak- en alcoholgebruik en een hoger T-stadium. Ook sterke p53 immunokleuring was geassocieerd met HPV-negatieve tumoren en roken en/of alcohol misbruik, maar niet met aneusomie en T-stadium. In de dysplasieën werden identieke HPV-status en chromosomale kopie aantallen gezien als in de aangrenzende tumoren. De ziektespecifieke overleving na 5 jaar was significant beter voor patiënten met HPV-positieve carcinenomen in vergelijking tot de HPV-negatieve TSCC groep (respectievelijk 30% versus 74%). Chromosomale instabiliteit was een significante indicator voor een ongunstige prognose in de totale TSCC groep, maar was zelfs een nog sterkere ongunstige voorspeller in de HPV-positieve patiënten groep.

Hoofdstuk 6 beschrijft de incidentie en de voorspellende waarde van de aanwezigheid van HPV en EGFR expressie in een serie vergevorderde OPSCC (n=111) en plaveiselcelcarcinomen van de hypofarynx (HPSCC, n=46), allemaal behandeld met gelijktijdige radiotherapie en chemotherapie (cisplatine). Eerdere studies die de relatie tussen EGFR expressie in hoofd-hals carcinenomen en overleving analyseerden, toonden verschillende uitkomsten. In de huidige studie werd HPV-positiviteit bepaald door middel van HPV16-specifieke FISH analyse in alle tumorcoupees en HPV-specifieke PCR in 10 gevallen. Op tissue microarrays van de tumor exemplaren werd p16^{INK4A} en EGFR immunohistochemie verricht. Zevenendertig van de 111 (33%) OPSCC liet een sterke p16^{INK4A} immunokleuring zien in meer dan 70% van de tumorcellen. Vijfendertig van deze 37 gevallen bevatten HPV16, beoordeeld door middel van de FISH analyse. De 2 p16^{INK4A} positieve, HPV16 FISH-negatieve casussen bleken HPV33-DNA te bevatten bij PCR-analyse. De HPV-positieve OPSCC groep toonde een significant hogere man-vrouw verhouding en deze patiënten waren minder vaak sigarettenrokers dan patiënten met een HPV-negatieve tumor. Drieënzeventig procent van de HPV-positieve OPSCC waren ook EGFR positief ten opzichte van 64% EGFR positieve gevallen bij de HPV-negatieve groep (geen significant verschil). HPV-positiviteit was geassocieerd met het optreden van minder locoregionale recidieven, minder metastasen op afstand en een gunstigere algehele - en ziektevrije overleving. Er werden geen associaties gevonden tussen EGFR expressie en overleving in de hele OPSCC groep en in de HPV-negatieve groep. Binnen de HPV-positieve groep hadden EGFR immunopositieve tumoren echter een significant slechtere overleving dan EGFR negatieve gevallen. Bovendien ontwikkelden 9 van de 31 rokers een recidief van de ziekte versus 1 van de 6 niet-rokers, hoewel dit verschil niet significant was. Slechts 1 HPSCC (2%) was zowel p16^{INK4A} en HPV-positief. In aanvulling op eerdere studies beschreven in dit

proefschrift, maakt de huidige studie duidelijk dat HPV-positieve tumoren geen homogene groep zijn en niet allemaal een gunstige therapie uitkomst hebben.

Hoofdstuk 7 bevat de algemene discussie en de conclusie van de in dit proefschrift beschreven resultaten. Bovendien zijn bevindingen vergeleken met de recente literatuur en worden toekomstperspectieven besproken.