

**IgG4 positive Plasmazellen im  
nodulär-sklerosierendem Hodgkin Lymphom im  
Vergleich zur folliculären Hyperplasie in Lymphknoten**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

**Verena Ilse Ursula Nowak**

aus Dortmund

2024

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachterin: Prof. Dr. med. Ines Gütgemann
2. Gutachterin: Jun. Prof. Dr. Stephanie Jung

Tag der Mündlichen Prüfung: 01.02.2024

Aus dem Institut für Pathologie  
Direktor: Prof. Dr. med. Glen Kristiansen

## Inhaltsverzeichnis

	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	5
<b>1.</b>	<b>Deutsche Zusammenfassung</b>	7
1.1	Einleitung	7
1.1.1	Zielsetzung	13
1.2	Material und Methoden	14
1.2.1	Die Patientenkohorte	14
1.2.2	Histologie und Immunhistochemie (IHC)	15
1.2.3	Auswertung	16
1.2.4	Statistik	17
1.3	Ergebnisse	17
1.3.1	Das nodulär-sklerosierende Hodgkin Lymphom	17
1.3.2	Die reaktive Lymphadenopathie mit folliculärer Hyperplasie	18
1.3.3	Vergleich des NSHL zur reaktiven Lymphadenopathie	19
1.4	Diskussion	21
1.5	Zusammenfassung	26
1.6	Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	26
<b>2.</b>	<b>Veröffentlichung</b>	33
	Abstract	33
	Introduction	34
	Materials and Methods	36
	Results	38

Discussion	39
References	43
Tables and Figures	45
<b>3. Danksagung</b>	<b>50</b>

## Abkürzungsverzeichnis

CD15	Cluster of Differentiation 15
CD19	Cluster of Differentiation 19
CD30	Cluster of Differentiation 30
CH1 Domäne	Konstante Domäne 1
CH3 Domäne	Konstante Domäne 3
C1q	Komplementprotein C1q
Fab Arm	Antigen bindendes Fragment
Fcy-Rezeptor	Immunglobulin G bindender Fc-Rezeptor
FH	Follikuläre Hyperplasie
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HL	Hodgkin Lymphom
HPF	Hauptgesichtsfeld
HRS	Reed Sternberg Zelle
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IgG+	Immunglobulin G exprimierend
IgG1	Immunglobulin des Subtyps G1
IgG4	Immunglobulin des Subtyps G4
IgG4+	Immunglobulin des Subtyps G4 exprimierend
IgG4-RD	IgG4-assoziierte Erkrankung
IHC	Immunhistochemie
IL-4	Interleukin 4

IL-5	Interleukin 5
IL-7	Interleukin 7
IL-8	Interleukin 8
IL-9	Interleukin 9
IL-10	Interleukin 10
IL-13	Interleukin 13
KI	Konfidenzintervall
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NLPHL	Noduläres lymphozytenreiches Hodgkin Lymphom
NSHL	Nodulär sklerosierendes Hodgkin Lymphom
ST2	Stimulationsgen 2
TAM	Tumor-assoziierten Makrophage
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor Beta
Th2-Zelle	Typ-2-T-Helferzelle
Tfh-Zelle	follikuläre T-Helferzelle
Tfr-Zelle	follikuläre regulatorische T-Zelle
TMA	Tissue Micro Array, Multigewebeblöcke
Treg-Zelle	regulatorische T-Zelle

# 1. Deutsche Zusammenfassung

## 1.1 Einleitung

Die IgG4-assoziierte Erkrankung ist ein schwerwiegendes, jedoch gut behandelbares, autoimmunes Krankheitsbild, welches sich in nahezu jedem Organsystem manifestieren kann. Hauptmerkmale sind tumorartige Läsionen mit einer begleitenden, meist systemischen, fibroinflammatorischen Entzündungsreaktion, welche sich histologisch hauptsächlich durch storiforme Fibrose, obliterative Phlebitis sowie einem zellreichem, gemischtzelligem, lymphoplasmazellulärem Infiltrat auszeichnet. Erhöhte IgG4-Konzentrationen treten sowohl im Gewebe als auch im Serum auf (Deshpande et al., 2011; Bledsoe et al., 2018). Die Aufnahme der „IgG4-assoziierten Erkrankung“ (IgG4 related disease, IgG4-RD) als eigenständiges Krankheitsbild in den Formenkreis der Autoimmunerkrankungen ist eine relativ neue Entwicklung (Kamisawa et al., 2003; Umehara et al., 2012a), welche das Verständnis der Erkrankung an sich und ihre Behandlungsstrategien reformiert hat.

Zu den am häufigsten betroffenen Organsystemen gehören vor allem der Abdominaltrakt, hier insbesondere das Pankreas, sowie der Kopf- und Halsbereich (vordergründig die Speichel- und Tränendrüsen) (Bledsoe et al., 2018). Mittlerweile wurde das Auftreten der IgG4-assoziierten Erkrankung in nahezu jedem Organsystem unter anderem in der Schilddrüse, Lunge, Lymphknoten, Leber oder Niere, als mögliche Lokalisation beschrieben (Detlefsen und Klöppel, 2018). Unabhängig von der betroffenen Region ist eine begleitende Lymphadenopathie häufig (Cheuk und Chan, 2012). Grundsätzlich kann sich die Erkrankung jedoch sowohl solitär als auch in mehreren Organen gleichzeitig manifestieren, auch eine metachrone Manifestation mehrerer Organsysteme ist möglich (Deshpande et al., 2012).

Epidemiologische Daten über die IgG4-assoziierte Erkrankung sind rar, Studien in Japan zeigten allerdings eine Prävalenz von 100 Fällen pro einer Millionen Einwohnern wobei insgesamt davon auszugehen ist, dass die Prävalenz der IgG4-assoziierten Erkrankung unterschätzt wird. Weiterhin ist jedoch damit zu rechnen, dass mit steigender Aufmerksamkeit für die Erkrankung diese aber zunehmend häufig erkannt und diagnostiziert wird (Kleger et al., 2015).

Die klinische Symptomatik hängt vordergründig von der Lokalisation der Manifestation der IgG4-assoziierten Erkrankung ab. Häufig wird eine tumorähnliche Vergrößerung des betroffenen Organs festgestellt. Dies kann durch bildgebende Verfahren diagnostiziert oder im Rahmen einer klinischen Untersuchung auch sicht- oder tastbar sein. Die Läsionen können durch Verdrängung und Obstruktion der sie umgebenden Strukturen weitere, regional unterschiedliche Symptome hervorrufen. Generalisierte Symptome wie Gewichtsverlust oder Leistungsminderung sind jedoch insgesamt selten, ein Gewichtsverlust tritt vor allem bei einer Manifestation im Bereich des Pankreas in Verbindung mit einer exokrinen Pankreasinsuffizienz und einem Malabsorptionssyndrom auf. Fieber tritt in der Regel nicht auf (Bledsoe et al., 2018; Maritati et al., 2020).

Als Diagnostik erfolgt neben bildgebenden Verfahren und klinischen Untersuchungen auch die laborparametrische Bestimmung der IgG4-Serumspiegel. Hierbei haben sich erhöhte IgG4-Serumspiegel ( $>135$  mg/dl) als sensitiv aber relativ unspezifisch erwiesen und reichen daher als alleiniges Kriterium zur Diagnosestellung nicht aus (Agaimy und Ihrler, 2014; Umehara et al., 2012b). Aufgrund der unspezifischen Klinik wird daher bei Verdacht auf die IgG4-assoziierte Erkrankung und zum differentialdiagnostischen Ausschluss anderer Erkrankungen regelhaft eine Biopsie der Läsion durchgeführt. Die Diagnosestellung erfolgt durch die Korrelation von klinischen Symptomen, Laborparametern und histologischer Gewebeuntersuchung.

Zur histologischen Diagnosestellung der IgG4-assoziierten Erkrankung werden nach Goldstandard die Konsenskriterien von Deshpande et. al. verwendet (Deshpande et al., 2012). Hierbei werden die immunhistochemisch gefärbten IgG4-positiven (IgG4+) Plasmazellen in drei Hauptgesichtsfeldern (high power fields, HPFs) jeweils in den Arealen mit der höchsten Dichte an IgG4+ Plasmazellen („Hotspots“) gezählt (siehe 1.2.2. Histologie und Immunhistochemie). Aus diesen wird anschließend der Mittelwert berechnet. Danach erfolgt die Auszählung der IgG-positiven (IgG+) Plasmazellen an korrespondierenden Arealen in analoger Weise. Die Ratio von IgG4/IgG (Mittelwerte) von mehr als 0,4 ist ein obligates Kriterium für die Diagnose einer IgG4-assoziierten Erkrankung. Des Weiteren ist die Dichte der IgG4+ Plasmazellen relevant, hier ist jeweils organspezifisch eine Anzahl von mindestens 10 IgG4+ Plasmazellen pro HPF in den Meningen bis hin zu 200 IgG4+ Plasmazellen pro HPF in der Haut als Grenzwert festgelegt (Deshpande et al.,



2012). Hierbei ist wichtig, dass die Anzahl der IgG4+ Plasmazellen durch die Art der Biopsie (Nadelbiopsien oder Exzisionsbiopsien) beeinflusst wird und in letzteren in der Regel höher liegt.

Berücksichtigt werden zudem die folgenden typischen histomorphologischen Kriterien:

- i) dichtes lymphoplasmozelluläres Infiltrat
- ii) storiforme Fibrose
- iii) obliterative Phlebitis

Grundsätzlich wird auf eine strikte Korrelation von klinischer Symptomatik, laborchemischen Parametern und histopathologischer Befunde zur Diagnosestellung hingewiesen. Wie oben erwähnt, ist bei der histologischen Gewebsuntersuchung eine IgG4/IgG Ratio von  $>0,4$  pro HPF sowie eine Erhöhung der absoluten Anzahl an IgG4+ Plasmazellen obligat. Nach Auszählung der IgG4+ Plasmazellen in beschriebener Weise, erfolgt die Korrelation mit den charakteristischen histomorphologischen Kriterien. Bei Vorhandensein mehrerer Charakteristika kann, gemäß den Konsenskriterien von Deshpande et al., je nach betroffenem Organ ein unterschiedlicher Grenzwert der absoluten Anzahl der IgG4+ Plasmazellen angenommen werden. Deshpande et al. schlagen vor, dass die Kombination aus histomorphologischen Kriterien, Anzahl der IgG4+ Plasmazellen pro HPF sowie IgG4/IgG Ratio pro HPF zur Einordnung in eine der folgenden Kategorien führt (Deshpande et al., 2012):

- (i) histologisch höchst suggestiv für die IgG4-assoziierte Erkrankung
- (ii) wahrscheinliche histologische Merkmale einer IgG4-assoziierten Erkrankung
- (iii) unzureichender histopathologischer Nachweis einer IgG4-assoziierten Erkrankung

Bei der Manifestation bei der IgG4-assoziierten Erkrankung in Lymphknoten lassen sich neben der erhöhten Anzahl an IgG4+ Plasmazellen verschiedene histologische Muster unterscheiden:

- i) das Castleman Krankheit ähnliche Muster
- ii) das follikulär hyperplastische Muster

- iii) das interfollikulär expansive Muster
- iv) das Muster mit progressiver Transformation der Keimzentren
- v) das entzündliche pseudotumorähnliche Muster (Ferry, 2013)

Während die erforderliche IgG4/IgG Ratio in Lymphknoten oder auch in anderen Organen relativ unumstritten ist, finden sich in der Literatur hinsichtlich der absoluten Anzahl der erforderlichen IgG4+ Plasmazellen unterschiedliche Grenzwerte. Zum einen unterscheiden, in Abhängigkeit von weiteren typischen histopathologischen Merkmalen, die vorgeschlagenen internationalen Konsenskriterien zwischen 50 oder 100 erforderlichen IgG4+ Plasmazellen, während an anderer Stelle bereits der strengere Grenzwert von 100 IgG4+ Plasmazellen vorgeschlagen wird, um die Spezifität der Diagnosekriterien zu erhöhen und die IgG4 assoziierte Erkrankung von anderen entzündlichen Krankheitsbildern abzugrenzen (Deshpande et al., 2012; Zenggang Pan, 2017; Cheuk und Chan, 2012).

Die aufgeführten Kriterien sind sensitiv, jedoch nicht spezifisch für die IgG4-assoziierte Erkrankung. Insbesondere die Abgrenzung der IgG4-assoziierten Erkrankung gegenüber anderen chronisch inflammatorischen sowie Tumorerkrankungen, insbesondere auch aus dem hämatologischen Bereich, stellt mitunter eine Herausforderung dar (Chen et al., 2019). Daher geht diese Dissertation der Frage nach, ob die Abgrenzung zum klassischen Hodgkin Lymphom (HL) in die Regeldiagnostik der IgG4-assoziierten Erkrankung aufgenommen werden sollte.

Immunglobulin G4 (IgG4) ist eine von vier bekannten Subklassen des Immunglobulin G (IgG) des Menschen und mit einem Anteil von nur 1-5 % der seltenste Typ (Witte, 2016). Gegenüber den anderen Subtypen weist IgG4 einige besondere Eigenschaften auf. So aktiviert IgG4 nicht wie die anderen Subtypen die klassische Komplementkaskade durch Bindung an ein Antigen mit anschließender Bildung eines Immunkomplexes (Witte, 2016). Als weitere besondere Eigenschaft ist IgG4 anders als andere IgG Subtypen in der Lage, aufgrund seiner instabilen Hinge-Region, in zwei Hemimoleküle zu je einer Schwer- und einer Leichtkette zu zerfallen und mit anderen Hemimolekülen eine Verbindung einzugehen. Ermöglicht wird dies durch den Austausch einer Aminosäure im Bereich der Hinge-Region im Vergleich zu IgG1. Bei IgG4 wird hier ein Prolin durch ein Serin ersetzt (Aalberse et al., 2009; van der Neut Kofschoten et al., 2007). Aufgrund starker nicht-kovalenter Bindungen zwischen der CH3 Domänen sowie der CH1 Domäne, handelt es sich

jedoch bei IgG4 insgesamt um ein stabiles Molekül, das bei physiologischen Bedingungen aus vier Ketten zusammengesetzt ist. Der Fab-Arm Austausch führt dazu, dass aus symmetrischen, homo-bivalenten, cross-linking Antikörpern, asymmetrische, hetero-bivalente Antikörper werden, die sich jedoch meist funktionell wie monovalente, nicht cross-linking Antikörper verhalten und somit in der Regel eine antiinflammatorische Rolle einnehmen. Zudem besteht eine allgemein niedrigere Affinität mit dem klassischen Fc $\gamma$ -Rezeptor oder mit C1q im Vergleich mit anderen IgG Subklassen (Aalberse und Schuurman, 2002; Aalberse et al., 2009). Des Weiteren führt der Umstand, dass IgG4 Antikörper an zwei verschiedene Antigene binden können dazu, dass kompetitiv andere Immunglobuline diese Bindungsstellen nicht nutzen und keine Immunkomplexe bilden können, weshalb auch auf diese Weise IgG4 Antikörper eine antiinflammatorische Wirkung entfalten können (Witte, 2016; Aalberse et al., 2009). IgG4 kann jedoch auch pathologische Eigenschaften, etwa in Form von antigenspezifischen Autoantikörpern im Rahmen einer wachsenden Gruppe von IgG4 assoziierten Autoimmunerkrankungen, aufweisen. Diese betreffen hauptsächlich vier Organsysteme: Das zentrale und periphere Nervensystem, die Haut und Schleimhäute, die Nieren und das Gefäßsystem und beruhen, im Unterschied zum Formenkreis der IgG4 assoziierten Erkrankungen, auf einer direkten, antigenspezifischen, pathologischen Reaktion durch Blockade einzelner Interaktionen zwischen Proteinen (Konecny, 2020). Sofern IgG4 nun an ein spezifisches Antigen bindet, wird somit verhindert, dass durch eine alternative Bindung eines anderen Antikörpers eine proinflammatorische Signalkaskade in Gang gesetzt wird. Die antiinflammatorische Wirkung von IgG4 ist vor allem bei der Toleranzinduktion und bei der Desensibilisierung von Allergenen wie zum Beispiel gegen Wespen und Bienengift im Vergleich zur Immunglobulin E (IgE) Bildung gut belegt und zu beobachten: So zeigt sich, dass eine Bildung von IgE und IgG4 vor allem durch Interleukin 4 (IL-4) und Interleukin 13 (IL-13) angeregt wird, wobei im Falle einer allergischen Reaktion IgE in der Regel vor IgG4 gebildet wird. Demgegenüber wird bei zusätzlich vorhandenem Interleukin 10 (IL-10), welches vor allen Dingen von Typ-2-T-Helferzellen (Th2), folliculären T-Helferzellen (Tfh) und regulatorischen T-Zellen (Treg) sezerniert wird, nur die Bildung von IgG4 beobachtet. Mit Fortschreiten einer normalen Immunantwort treten nach einer initialen proinflammatorischen Reaktion regulatorische Mechanismen in den Vordergrund, wobei hier vor allem die regulatorischen T-Zellen IL-10 sezernieren. Zusätzlich scheint IL-10 zudem nicht nur beim Klassenwechsel von IgE zu IgG4

eine Rolle zu spielen, sondern darüber hinaus auch bei der Differenzierung von IgG4 B-Zellen zu IgG4 sezernierenden Plasmazellen. Dies ist insofern von Bedeutung, als dass in der Pathophysiologie der IgG4-assozierten Erkrankung vor allem die Subpopulation der Th2, Tfh, Treg Zellen aktiviert werden und sich zahlreich im betroffenen Gewebe nachweisen lassen. (Witte, 2016; Aalberse et al., 2009; Hsieh et al., 2020). Grundsätzlich bleibt die genaue Pathogenese der IgG4-assozierten Erkrankung jedoch weiter unklar. Interessanterweise besteht jedoch eine erhöhte Komorbidität bei Patienten mit IgG4-assoziierter Erkrankung und allergischen Erkrankungen. So scheinen beide Krankheitsbilder ähnliche immunopathologischen Eigenschaften zu teilen, wobei beide mit einer Aktivierung einer Th2-Zell vermittelten Immunantwort, einer erhöhten IgE und IgG4 Produktion, Eosinophilie und Infiltration von Mastzellen im betroffenen Gewebe einhergehen (Michailidou et al., 2021). So fand sich sowohl im peripheren Blut als auch im betroffenen Gewebe bei Patienten mit IgG4-assoziierter Dakryoadenitis und Sialadenitis ein signifikanter Anstieg von Th2-Zellen, die zum einen durch Expression des Stimulationsgen 2 (ST2), zum anderen durch eine hohe Interleukin 5 (IL-5) Expression gekennzeichnet waren (Yamamoto et al., 2019; Michailidou et al., 2021). Darüber hinaus zeigten sich erhöhte Werte für Th2 assoziierte Zytokine wie IL-4, IL-5 und IL-13 im betroffenen Gewebe bei Patienten mit IgG4 assoziierter Pankreatitis und Cholangitis (Zen et al., 2007; Michailidou et al., 2021). Effektorzellen wie eosinophile oder basophile Granulozyten können auch direkt Typ-2-Immunantworten vermitteln. Diese Zellen werden in der Regel durch Typ-2-Zytokine wie IL-5 rekrutiert. Eosinophile Granulozyten können zudem selber zur Pathogenese der IgG4-assozierten Erkrankung beitragen, indem sie über die Produktion von Transforming Growth Factor beta (TGF- $\beta$ ) und IL-13 eine direkte profibrotische Wirkung entfalten (Michailidou et al., 2021). IL-10 und TGF- $\beta$ , welche von Tregs sezerniert werden, tragen sowohl zum Klassenwechsel hin zu IgG4 produzierenden Plasmazellen als auch zu der histologisch markanten Fibrose bei (Kamisawa, 2022). Ein Erklärungsansatz zur Pathogenese ist daher, dass durch noch unbekannte Autoantigene eine von Th2-Zellen dominierte Immunantwort, welche mit vermehrter Produktion der Interleukine (IL) -4, -5, und 13 sowie Transforming Growth Factor beta (TGF- $\beta$ ) einhergeht, in den betroffenen Organen hervorgerufen wird (Kamisawa, 2022).

Das klassische Hodgkin Lymphom (HL) zeichnet sich histologisch durch die malignen Reed-Sternberg-Zellen (HRS) aus, wobei die Tumormikroumgebung aus einem

entzündlichen, gemischtzellulären Infiltrat besteht und durch unterschiedliche Grade an Sklerose gekennzeichnet ist. Das HL kann allgemein anhand morphologischer Kriterien in vier Subtypen eingeteilt werden:

- (i) den nodulär-sklerosierende Subtyp (NSHL)
- (ii) den lymphozytenreichen Subtyp
- (iii) den gemischtzelligen Subtyp
- (iv) den lymphozytenarmen Subtyp

Die histopathologische Diagnose erfolgt in der Regel morphologisch und immunhistochemisch, wobei am häufigsten die Marker CD30 und CD15 verwendet werden, um maligne Reed-Sternberg Zellen zu identifizieren (Wang et al., 2018).

Daneben gewinnt jedoch auch die Erforschung der Tumormikroumgebung des Hodgkins Lymphoms an Bedeutung. So konnte gezeigt werden, dass erhöhte, posttherapeutische IL-10 Serumwerte mit einem geringeren progressionsfreiem Überleben assoziiert sind (Hsi et al., 2019).

Das entzündliche Zellinfiltrat bei der IgG4-assoziierten Erkrankung, zu dem auch die IgG4+ Plasmazellen zählen, aktivieren über Zytokine wie IL-13 und TGF- $\beta$  in dem betroffenen Gewebe Myofibroblasten, wodurch es zu der charakteristischen storiformen Fibrose kommt (Maslinska et al., 2021; Witte, 2016). Das Fortschreiten des Entzündungsprozesses kann sich auch in der histopathologischen Präsentation widerspiegeln wonach zunächst ein zellreiches Entzündungsinfiltrat vorherrscht, welches nach einiger Zeit durch ein durch die Fibrose vorherrschendes Bild abgelöst wird (Maslinska et al., 2021). Auf die Frage, inwiefern die bei der IgG4-assoziierten Erkrankung beobachteten Fibrose sowie das ebenfalls durch Fibrose gekennzeichnete Immunstroma des NSHL durch ein ähnliches Zytokinmuster beeinflusst wird, wird in der Diskussion weiter eingegangen.

### 1.1.1 Zielsetzung

Aufgrund der vielfältigen Manifestationsmöglichkeiten der IgG4-assoziierten Erkrankung, kommen, je nach Lokalisation, viele Differentialdiagnosen in Betracht. Dazu gehören auch Karzinome, deren Ausschluss vor dem Stellen der Diagnose einer IgG4-assoziierten Erkrankung an erster Stelle stehen. Auch Lymphome werden als potentielle Differentialdiagnosen der IgG4-assoziierten Erkrankung erwähnt (Stone et al., 2015). In der klinischen

Praxis ist es von großer Wichtigkeit, effizient die wichtigsten Differentialdiagnosen und ihre potenziellen Fallstricke zu kennen und strukturiert die richtige Diagnose zu stellen. Maligne HRS machen jedoch lediglich 0,1 bis 10% des betroffenen Gewebes aus (Küppers, 2009), sodass die Identifikation dieser Zellen bei einer Standard Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) vor dem Hintergrund eines zellreichen Entzündungsinfiltrat mitunter eine Herausforderung darstellen kann. Abzugrenzen ist in der klinischen Praxis demgegenüber die Diagnose einer nicht neoplastischen, entzündlichen Erkrankung wie die der IgG4-assoziierten Erkrankung. Das entzündliche Zellinfiltrat bei der IgG4-assoziierten Erkrankung, zu dem auch die IgG4+ Plasmazellen zählen, aktiviert in dem betroffenen Gewebe Myofibroblasten, wodurch es zu der charakteristischen storiformen Fibrose kommt. Das Fortschreiten des Entzündungsprozesses kann sich auch in der histopathologischen Präsentation widerspiegeln wonach zunächst ein zellreiches Entzündungsinfiltrat vorherrscht, welches nach einiger Zeit durch ein durch die Fibrose vorherrschendes Bild abgelöst wird (Maslinska et al., 2021). Ein initiales Screening des von Khristi et al. erstellten Tissue Micro Array (TMA, Multigewebeblöcke) lymphatischer Neoplasien aus der Datenbank des Instituts für Pathologie zeigte, dass Gewebeproben von NSHL selektiv viele IgG4+ Plasmazellen aufwiesen (Khristi et al., 2013). Aufgrund dieser Beobachtung und dem Umstand, dass die Sklerose beim NSHL am stärksten ausgeprägt ist und somit dem Erscheinungsbild der IgG4-assoziierten Erkrankung am nächsten kommt, untersucht diese Arbeit konsekutiv in einem systematischeren Ansatz das Muster und die Verteilung von IgG4-positiven Plasmazellen im NSHL. Das NSHL kommt der histologischen Morphologie der IgG4-assoziierten Erkrankung nahe, die Diagnostik des NSHL erfolgt, abweichend von der IgG4-assoziierten Erkrankung, primär anhand der eingangs erwähnten histologisch und immunhistochemischen Marker. Diese Verwechslungsgefahr besteht vor allem dann, wenn nur wenig Untersuchungsmaterial vorhanden ist, wie zum Beispiel bei kleinen unvollständig exzidierten Lymphknoten- oder Weichteilbiopsien mit einem dichten lymphoplasmazellulären Infiltrat.

Bisher wurde keine umfassende Studie durchgeführt, die die Häufigkeit von IgG4+ Plasmazellen und die IgG4/IgG Ratio bei NSHL im Vergleich zur IgG4-assoziierten Erkrankung und das Potenzial einer Verwechslung untersucht. Diese Arbeit untersucht das Vorhandensein von IgG4 positiven Zellen im NSHL und beschäftigt sich mit der Frage, inwiefern der gesicherte Ausschluss eines NSHL vor der Diagnose einer IgG4-assoziierten

Erkrankung ratsam oder sogar erforderlich ist. Die Studie soll so einen Beitrag zur Vermeidung von potenziellen Fehldiagnosen in der klinischen Praxis leisten.

## 1.2 Material und Methoden

### 1.2.1 Die Patientenkohorte

In einem initialen Screening eines TMA mit insgesamt 540 lymphatischen Neoplasien wurde dieser zunächst auf das Vorhandensein von IgG4+ Plasmazellen untersucht. Hierbei wurden sowohl Hodgkin Lymphome (HL) als auch Non-Hodgkin Lymphome (NHL) erfasst. Der TMA wurde von Khristi et al. aus Fällen aus dem Archiv (1993-2011) des Instituts für Pathologie erstellt (Khristi et al., 2013). Beim Screening wiesen Fälle mit NSHL eine erhöhte Anzahl an IgG4+ Plasmazellen auf. Bei diesem rein explorativen Ansatz ist es nicht möglich IgG4 positive Zellen zu quantifizieren, weswegen ein systematischerer Ansatz mit Fällen aus dem Archiv des Instituts für Pathologie Bonn bei denen ausreichendes, nicht mehr für die Diagnostik benötigtes Gewebematerial verfügbar war, ausgewählt wurde. Hierfür wurden Standardparaffinschnitte untersucht an denen noch ausreichend Material vorhanden war und welche im Rahmen unseres Ethikvotums erfasst waren. Aus dem Archiv des Instituts für Pathologie sammelte V. Nowak insgesamt 24 in toto-exziierte Lymphknoten aus den Jahren 2009 bis 2018 mit der Erstdiagnose eines NSHL. Klinische Hinweise auf eine IgG4-assoziierte Erkrankung lagen nicht vor. Die Objektträger wurden von I. Gütgemann erneut untersucht und die Diagnose eines NSHL sowie respektiv einer reaktiven Lymphadenopathie bestätigt. Das Alter der Patienten reichte von 11 bis 70 Jahren, das Durchschnittsalter belief sich auf 31 Jahre mit einer Standardabweichung von 17 Jahren. Insgesamt wurden Biopsien von zehn Männern und vierzehn Frauen eingeschlossen.

Zur Kontrolle wurden zusätzlich zehn Biopsien von solitären, reaktiv veränderten Lymphknoten mit folliculärer Hyperplasie ohne klinischen oder histologischen Nachweis einer spezifischen Infektion oder Neoplasie ausgewählt. Die Kohorte umfasste vier Männer und sechs Frauen mit einem Alter zwischen 8 und 63 Jahren, das Durchschnittsalter belief sich hier auf 17 Jahre mit einer Standardabweichung von 16 Jahren. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Bonn geprüft und genehmigt (Nr. 236, 10/2018).

### 1.2.2 Histologie und Immunhistochemie (IHC)

Alle Proben wurden in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und nach den Standards des Instituts der Pathologie des Universitätsklinikums Bonn von Mitarbeitenden des Instituts geschnitten, auf Objektträgern fixiert und gefärbt. Alle eingeschlossenen Biopsien maßen mindestens 1 cm im Durchmesser. Die Objektträger wurden zunächst mit einer Standard Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) gefärbt, um die mikroskopische Morphologie zu beurteilen. Für die immunhistochemische Färbung (IHC) wurden die Standardparaffinschnitte (2-3 µm) in 200 ml Target-Retrieval-Lösung (Citratpuffer; pH 6,0) eingelegt, für 20 Minuten auf 100 °C erhitzt und anschließend mit Tris-gepufferter Kochsalzlösung ausgewaschen. Die endogene Peroxidase wurde mit Wasserstoffperoxid blockiert. Die primäre Antikörperfärbung erfolgte mit monoklonalen Antikörpern gegen IgG4 (Acris, Origene, Herford, Deutschland; SM2069P; Verdünnung = 1:250, Vorbehandlung = 0,1 % Protease), IgG (Agilent, Santa Clara, CA, USA, A 0423; Verdünnung = 1:30 000, Vorbehandlung = 0,01 % Protease) und CD30 (Ber-H2, Roche, Basel, Schweiz; vorverdünnt). Das Diaminobenzidin (DAB) IHC Detection Kit und ein halbautomatischer IHC-Färbeautomat (Autostainer 480S; Medac, Deutschland) wurden für die Gegenfärbung und Entwicklung der IgG4- und IgG-Färbungen verwendet. Das Ventana Opti-View System (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) wurde für die CD30-Färbung verwendet.

### 1.2.3 Auswertung

Nach Einweisung von I. Gütgemann wurden IgG4+ Plasmazellen in allen Schnitten von V. Nowak quantifiziert, indem drei Gesichtsfelder in Arealen mit dem dichtesten Infiltrat an IgG4+ Zellen ausgewählt und ausgezählt wurden. Hierdurch erfolgte das Scoring immer durch die gleichen Untersucher, um einen einheitlichen Bewertungsmaßstab zu gewährleisten.

Anschließend erfolgte die Quantifizierung der IgG+ Plasmazellen in benachbarten seriellen Schnitten. Ein HPF entsprach einer Fläche von 0,22 mm<sup>2</sup> bei Verwendung eines ×40 Objektivs und eines ×10 Okulars. Zur weiteren Verwendung erfolgte anschließend die Berechnung des Mittelwerts und des Medians. Der Mittelwert wurde verwendet, um die IgG4/IgG Ratio gemäß den internationalen Konsenskriterien für die IgG4-assoziierte



Erkrankung zu bestimmen (Deshpande et al., 2012). IgG4+ Plasmazellen wurden gemäß der Konsenskriterien als erhöht angesehen, wenn >50 IgG4+ Plasmazellen pro HPF beobachtet wurden. Gleichfalls wurde, wie in der Konsenserklärung zur Pathologie der IgG4-assoziierten Erkrankung vorgeschlagen (Deshpande et al., 2012), eine IgG4/IgG Ratio von >0,4 als erhöht angesehen.

Zur Dokumentation wurden repräsentative Schnitte mit einem BX51-Mikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland) durch V. Nowak und I. Gütgemann aufgenommen. Dieses war mit einer Zeiss AxioCam MRc5-Kamera und der Axiovision-Imaging-Software (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) ausgestattet.

#### 1.2.4 Statistik

Für die statistische Analyse nutzte V. Nowak das Softwarepaket IBM SPSS (Chicago, Illinois, USA) für Windows (Version 25.0) und Microsoft Excel 2007. P-Werte <0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen. Zur Analyse wurde der Mann-Whitney U-Test durchgeführt, um die Anzahl der IgG4+ Plasmazellen und die IgG4/IgG-Ratio im nodulär-sklerosierenden Hodgkin Lymphom mit denen in der Vergleichskohorte ermittelten Werten zu vergleichen.

### 1.3 Ergebnisse

Es wurden insgesamt zehn reaktive Lymphknotenbiopsien mit folliculärer Hyperplasie sowie 24 Fälle mit NSHL mittels Immunhistochemiefärbung auf IgG4 und IgG gefärbt, um die Häufigkeit von IgG4+ Plasmazellen zu bestimmen und die IgG4/IgG Ratio in den Gewebeschnitten zu berechnen. Die Ergebnisse und klinisch-pathologischen Daten sind in den Tabellen 1 und 2 zusammengefasst (Nowak et al., 2020).

#### 1.3.1 Das nodulär-sklerosierende Hodgkin Lymphom

Klinische Hinweis auf eine IgG4-assoziierte Erkrankung lagen in keinem der Fälle vor. Im Median wurden 28 IgG4+ Plasmazellen pro HPF beobachtet, das Intervall reichte von

minimal 3 bis maximal 88 IgG4+ Plasmazellen pro HPF. Das 95 % Konfidenzintervall (KI) lag bei 24-43 positiven IgG4 Plasmazellen. Fünf Fälle (21 %) erfüllten die Kriterien für eine erhöhte Anzahl von IgG4+ Plasmazellen mit >50 IgG4+ Plasmazellen pro HPF und einer IgG4/IgG Ratio >0,4 und entsprachen damit den Konsenskriterien für eine wahrscheinliche Diagnose der IgG4-assoziierten Erkrankung (Nowak et al., 2020; Deshpande et al., 2012). Keiner erfüllte die strengeren Kriterien von >100 IgG4+-Plasmazellen, wie sie ebenfalls für die Diagnose von IgG4-assoziierten Erkrankungen in Lymphknoten vorgeschlagen werden (Deshpande et al., 2012; Ferry, 2013).

**Tab. 1:** Die Daten der Patientinnen und Patienten der untersuchten Kohorte mit NSHL sowie die mittlere Anzahl der IgG4+ Plasmazellen und die korrespondierende Standardabweichung sowie die IgG4/IgG Ratio in Prozent. NB\*: nicht bestimmt; dies bedeutet, dass keine IgG+ Plasmazellen erkennbar waren; SD\*\*: Standardabweichung; m: männlich; w: weiblich; HPF: High-power field, Hauptgesichtsfeld (Nowak et al., 2020).

Patient	Alter	Geschlecht	Lokalisation	Durchschnitt IgG4/HPF	SD** IgG4/HPF	IgG4/IgG Ratio (%)
1	27	w	subclavikulär	44	4	50
2	22	w	supraklavikulär	21	3	39
3	10	m	mediastinal	32	6	64
4	53	m	supraclavikulär	72	18	40
5	54	m	axillär	27	1	31
6	14	w	supraclavikulär	15	3	19
7	15	w	supraclavikulär	17	3	26
8	34	w	inguinal	20	1	29
9	63	m	cervikal	72	6	45
10	18	m	cervikal	56	6	78
11	16	m	supraclavikulär	51	2	53
12	20	w	subclavikulär	29	3	34
13	42	m	cervikal	28	2	NB*
14	24	w	supraclavikulär	51	7	NB*
15	14	m	supraclavikulär	44	6	66
16	23	w	cervikal/ supraclavikulär	12	1	28
17	41	m	supraclavikulär	12	2	47
18	42	w	cervikal	46	2	50
19	70	w	cervikal	20	1	21
20	14	w	cervikal	88	11	66
21	40	w	supraclavikulär	6	1	8
22	12	w	supraclavikulär	3	3	9
23	27	w	cervikal	19	2	6
24	54	m	mediastinal	17	3	26

### 1.3.2 Die reaktive Lymphadenopathie mit folliculärer Hyperplasie

Solitäre Lymphadenopathien mit folliculärem Hyperplasiemuster, die wegen des klinischen Verdachts auf ein Lymphom exzidiert wurden, dienten als Kontrollkohorte. In den untersuchten Lymphknoten wurden durchschnittlich 8 IgG4+ Plasmazellen pro Gesichtsfeld bei einem Intervall von minimal 3 bis maximal 15 IgG4+ Plasmazellen beobachtet. Der Median lag bei 7 IgG4+ Plasmazellen pro HPF. Das 95 % Konfidenzintervall belief sich auf 6-11 IgG4+ Plasmazellen, wobei IgG4+ Plasmazellen im Parakortex häufiger waren als in den Keimzentren. Es wurde eine mittlere IgG4/IgG-Ratio von 0,18 ermittelt. Der Median lag hierbei bei 0,15 und das 95 % Konfidenzintervall bei 0,1-0,26. Die ermittelte IgG4/IgG Ratio reichte von 0,02-0,44 (Nowak et al., 2020).

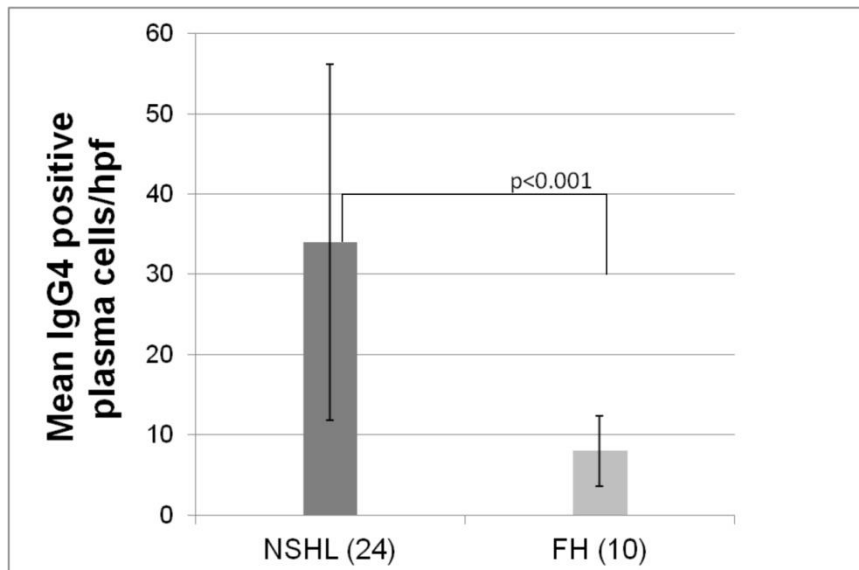
**Tab. 2:** Die Daten der Patientinnen und Patienten der untersuchten Kohorte mit reaktiver folliculärer Hyperplasie sowie die mittlere Anzahl der IgG4+ Plasmazellen und die korrespondierende Standardabweichung sowie die IgG4/IgG Ratio in Prozent. SD\*\*: Standardabweichung; m: männlich; w: weiblich; HPF: High-power field, Hauptgesichtsfeld. (Nowak et al., 2020).

Patient	Alter	Geschlecht	Lokalisation	Durchschnitt IgG4/HPF	SD** IgG4/HPF	IgG4/IgG Ratio (%)
1	8	m	submandibulär	15	3	44
2	12	f	cervikal	3	1	7
3	14	f	cervikal	6	1	8
4	9	f	cervikal	8	3	18
5	11	m	präaurikular	5	2	29
6	11	m	bukkal	10	2	19
7	14	f	cervikal	12	1	2
8	11	f	cervikal	14	10	30
9	63	f	cervikal	3	1	9
10	15	m	cervikal	3	1	12

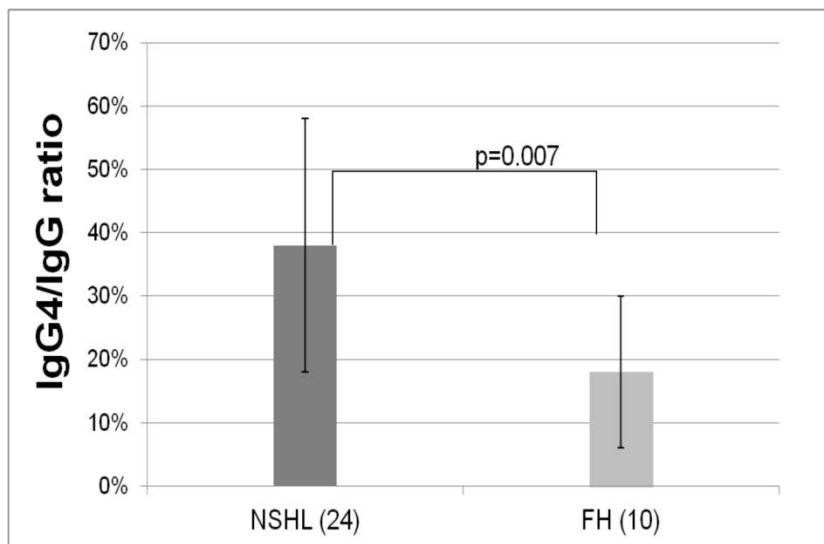
### 1.3.3 Vergleich des NSHL zur reaktiven Lymphadenopathie

Für den statistischen Vergleich der durchschnittlichen Anzahl der IgG4+ Plasmazellen im NSHL zur reaktiven folliculären Hyperplasie in Lymphknoten wurde der Mann-Whitney U-Test durchgeführt (Abb. 1). Die mittlere Anzahl von IgG4+ Plasmazellen pro HPF war im NSHL (34/HPF) statistisch signifikant höher als in reaktiven Lymphknoten mit folliculärer Hyperplasie (FH) (8/HPF;  $p < 0,001$ ). Darüber hinaus war die mittlere IgG4/IgG-Ratio beim

NSHL (0,38) signifikant höher als bei der reaktiven FH (0,18;  $p = 0,007$ ) (Abb. 2) (Nowak et al., 2020).



**Abb. 1:** Erhöhte Anzahl der IgG4+ Plasmazellen in den untersuchten Biopsien des NSHL im Vergleich zu den Biopsien mit reaktiver follikulärer Hyperplasie (FH). Die eingeschlossenen Fallzahlen werden in den Klammern angezeigt. Der P-Wert wurde mittels Mann-Whitney U-Test ermittelt. Der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung innerhalb der untersuchten Kohorte an (Nowak et al., 2020).



**Abb. 2:** Erhöhte IgG4/IgG Ratio in den untersuchten Biopsien des NSHL im Vergleich zu den Biopsien mit reaktiver follikulärer Hyperplasie (FH). Die Fallzahlen werden in den Klammern angezeigt. Der P-Wert wurde mittels Mann-Whitney U-Test ermittelt. Der

Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung innerhalb der untersuchten Kohorte an (Nowak et al., 2020).

#### 1.4 Diskussion

Der Nachweis eines lymphoplasmatischen Infiltrats mit einer erhöhten Anzahl von IgG4+ Plasmazellen, einer IgG4/IgG Ratio  $>0,4$  sowie storiformer Fibrosklerose variablen Grades stellen Hauptmerkmale der Diagnose der IgG4-assoziierten Erkrankung dar (Deshpande et al., 2012; Ferry, 2013). Angesichts der Tatsache, dass erhöhte IgG4+ Plasmazellen in verschiedenen chronisch-entzündlichen Läsionen ubiquitär vorkommen, kann das zusätzliche Vorhandensein von Fibrosklerose die differentialdiagnostische Abklärung solcher Läsionen erschweren (Strehl et al., 2011). Die IgG4-assoziierte Erkrankung stellt hierbei eine wichtige differentialdiagnostische Überlegung dar.

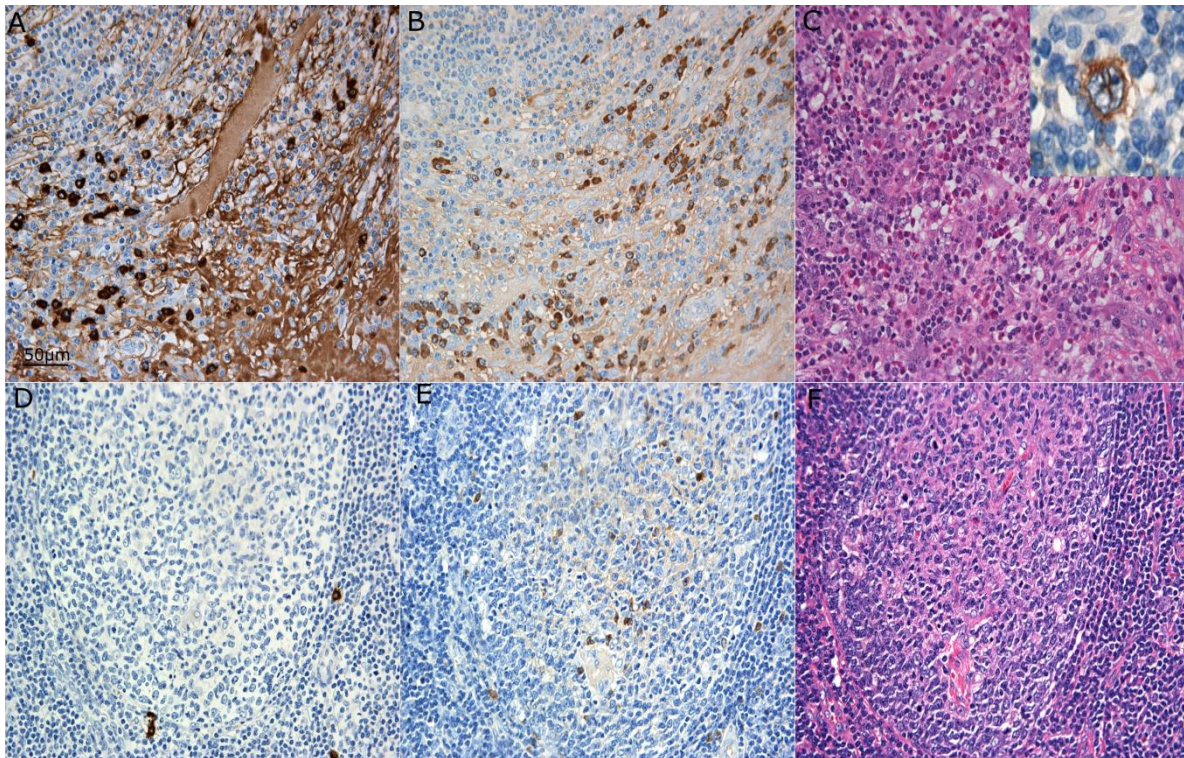
Die Studie zeigt, dass die Anzahl an IgG4+ Fällen sowie die IgG4/IgG Ratio im NSHL im Vergleich zu reaktiv veränderten Lymphknoten signifikant erhöht ist und dass die Konsenskriterien der IgG4-assoziierten Erkrankungen bei NSHL in einigen Fällen zu Fehldiagnosen führen können. Insbesondere bei einem NSHL mit gemischtem lymphozyten- und plasmazellreichen, inflammatorischem Infiltrat mit erhöhter Anzahl an IgG4+ Plasmazellen und ausgeprägter Fibrose, wird eine IgG4-assoziierte Erkrankung imitiert. Dieser Befund ist von großer klinischer Bedeutung im Hinblick auf eine adäquate Diagnosestellung und somit auch Therapie.

In Lymphknoten erlaubt, entsprechend den internationalen Konsenskriterien, das Vorhandensein von mehr als einem histopathologischen Kriterium in Kombination mit  $>50$  IgG4+ Plasmazellen die Diagnose „wahrscheinliche histologische Merkmale einer IgG4-assoziierten Erkrankung“ (Deshpande et al., 2012). In 5 von 24 Fällen von NSHL in unserer Studie wurden Areale in Lymphknoten mit einem Mittelwert von  $>50$  IgG4+ Plasmazellen pro HPF identifiziert, in diesen Fällen wurde auch eine IgG4/IgG-Ratio  $>0,4$  ermittelt, so dass formal die Konsenskriterien für die IgG4-assoziierte Erkrankung erfüllt wurden. Im Mittel lag jedoch die IgG4/IgG Ratio bei 0,38. Kein Fall überschritt einen Mittelwert von  $>100$  IgG4+ Plasmazellen. Die Anzahl der IgG4+ Plasmazellen im NSHL variierte stark: von nur einer positiven IgG4 Plasmazelle pro HPF bis zu über 100 IgG4+ Plasmazellen

pro HPF, wobei die durchschnittliche Anzahl von IgG4+ Plasmazellen in den einzelnen Fällen zwischen 3 bis 88 IgG4+ Plasmazellen schwankte. Dieser Umstand weist auf eine insgesamt hohe Variabilität und eine heterogene Verteilung innerhalb eines Gewebeschnitts hin.

Die funktionelle Rolle von IgG4+ Plasmazellen als Teil des Spektrums chronischer Entzündungsreaktionen in Lymphknoten bedarf jedoch noch weiterer Untersuchung. Eine alleinige Bestimmung der IgG4+ Plasmazellen ist jedoch nicht ausreichend spezifisch für die Diagnose der IgG4-assoziierten Erkrankung. Nichtsdestotrotz liegen die absoluten Werte in solchen Fällen bereits häufig oberhalb der Werte, welche man bei einem lediglich unspezifischen entzündlichen Hintergrund erwarten würde (Martinez et al., 2014).

Unsere Studie zeigt, dass die für die Diagnose der IgG4-assoziierten Erkrankung erforderlichen histopathologischen Parameter und Merkmale bei Lymphknotenmanifestationen des NSHL häufig zutreffen. Dies unterstreicht die Notwendigkeit das Vorhandensein von HRS-Zellen in solchen Biopsien sorgfältig auszuschließen und die Befunde mit klinischen und radiologischen Informationen zu korrelieren. Insbesondere können solitäre reaktive Lymphknoten ohne klinische Symptome für eine IgG4-assoziierte Erkrankung erhöhte IgG4+ Plasmazellzahlen aufweisen, sodass Schwellen- und Grenzwerte mit Vorsicht zu beurteilen sind (Deshpande et al., 2012; Martinez et al., 2014). In einer aktuellen Konsenserklärung wurde ein Minimum von 100 IgG4+ Plasmazellen in Lymphknoten vorgeschlagen, um die Spezifität zu erhöhen (Ferry, 2013; Cheuk und Chan, 2012). In Anbetracht der Tatsache, dass keiner unserer Fälle dieses Kriterium erfüllte, könnten strengere Kriterien die Spezifität der Diagnose der IgG4-assoziierten Erkrankung verbessern. Jedoch können mittlere Häufigkeiten immer noch zu einer falschen Diagnose der IgG4-assoziierten Erkrankung führen. Die Ergebnisse legen daher nahe, dass insbesondere bei der Anwendung weniger strenger Kriterien bei Lymphknotenbiopsien mit Verdacht auf die IgG4-assoziierte Erkrankung eine sorgfältige mikroskopische Beurteilung und eine immunhistochemische Färbung mit Anti-CD30 ratsam ist, um ein NSHL auszuschließen (Abb. 3).



**Abb. 3:** Immunohistochemische Färbung auf IgG4 (A, D), IgG (B, E) sowie die HE-Färbung des korrespondierenden Areals (C, F). Die Abbildungen A-C zeigen das NSHL sowie einen Einschub einer CD30 positiven Zelle (C). Die Abbildungen D-F zeigen einen reaktiv veränderten Lymphknoten mit follikulärer Hyperplasie. Im Vergleich zeigen die Bilder D-F deutlich weniger IgG4+ und IgG+ Zellen als die Bilder A-C. Skala: 50 µm (Nowak et al., 2020).

Es existieren einzelne Fallberichte bei Kindern, bei denen die IgG4-assoziierte Erkrankung zunächst ein HL imitierte (Ewing und Hammer, 2016). Interessanterweise zeigten sich in diesen Fällen bei den durchgeführten Laboruntersuchungen zum einen erhöhte IgG4 und IgE Werte, zum anderen auch eine erhöhte IgG4/IgG-Ratio im Serum. Histologisch wurde auch bei follikulärer Hyperplasie mit progressiver Transformation der Keimzentren (PTGC) eine interfollikuläre Häufung von eosinophilen Zellen, Fibrose, große CD30 positive Zellen sowie IgG4+ Plasmazellen beobachtet. Dies könnte auf ein potenzielles diagnostisches Problem bei der Unterscheidung des HL von der IgG4-assoziierten Erkrankung und möglicherweise zusätzlich auch bei einem Morbus Castleman in der pädiatrischen Altersgruppe hinweisen (Zenggang Pan, 2017).

Zudem scheinen eine erhöhte Anzahl an IgG4+ Plasmazellen dabei zu helfen zwischen dem nodulären lymphozytenreichen Hodgkin Lymphom (NLPHL) und PTGC zu unterscheiden (Kiil et al., 2018). Dabei sind IgG4+ Plasmazellen im NLPHL nur spärlich

vorhanden. PTGC hingegen ist mit einer erhöhten Anzahl an IgG4+ Plasmazellen assoziiert und als potentielltes Muster der IgG4-assoziierten Erkrankung bekannt (Kiil et al., 2018; Sato et al., 2012). Dies ist insofern von Bedeutung, als dass im Frühstadium NPHL und PTGC sich in ihrer morphologischen Präsentation ähneln.

Von allen histomorphologischen Mustern, welche in Lymphknoten beschrieben werden, ähnelt der entzündliche pseudotumor-ähnliche Typ am ehesten der histopathologischen Manifestation des Hodgkin Lymphoms. Maßgeblich hierfür ist das Vorhandensein fokaler ausgeprägter Fibrosklerose und ein gemischtzelliges Infiltrat an Lymphozyten, Plasmazellen und eosinophilen Granulozyten (Ferry, 2013; Zenggang Pan, 2017).

Interessanterweise wurden in unserer Studie Aggregate von IgG4+ Plasmazellen häufig in der Nähe von Arealen mit ausgeprägter Sklerose beobachtet. Im Gegensatz dazu sind IgG4+ Plasmazellen bei der IgG4-assoziierten Erkrankung hauptsächlich in einem diffusen Muster verteilt. Künftig könnte das Verteilungsmuster von IgG4+ Plasmazellen sowie weiteren Entzündungszellen bei HL, Morbus Castleman und der IgG4-assoziierten Erkrankung von größerem wissenschaftlichen Interesse sein, um zu entschlüsseln, ob das Verteilungsmuster von IgG4-positiven Zellen möglicherweise ein Unterscheidungsmerkmal gegenüber anderen Erkrankungen darstellen könnte. Ergänzend könnte die Entschlüsselung der Rolle von profibrotischen Zytokinen wie Transforming Growth Factor Beta (TGF- $\beta$ ) und Interleukin 10 (IL-10) wichtig sein, um die biologische Rolle der IgG4+ Plasmazellen bei der IgG4-assoziierten Erkrankung zu beurteilen. Diskutiert wird darüber hinaus, dass IgG4+ Plasmazellen eine Erklärung für die prominente Sklerose darstellen, speziell bei einigen neoplastischen Erkrankungen, die mit einer ausgeprägten Entzündung, wie zum Beispiel dem mukoepidermalen Karzinom, einhergehen (Tian et al., 2012).

Der genaue Mechanismus beim NSHL, der es den HRS-Zellen ermöglicht, dem eigenen Immunsystem des Patienten zu entkommen, ist nach wie vor unbekannt, fest steht jedoch, dass sich das klassische Hodgkin Lymphom durch eine dysregulierte Zytokinproduktion durch das umgebende Immunstroma sowie der HRS auszeichnet (Vardhana und Younes, 2016; Nakayama et al., 2016). Wie in der Einführung bereits erwähnt, machen die malignen HRS lediglich einen kleinen Teil der Tumormasse des NSHL aus und sind von einem zellreichen, entzündlichen Infiltrat bestehend aus T- und B-Zellen, tumor-assoziierten Makrophagen (TAMs), Mastzellen, eosinophilen Granulozyten, myeloiden



Suppressorzellen und NK-Zellen, sowie kollagen-reicher, fibrotischer extrazellulärer Matrix umgeben (Ribatti et al., 2022). Das komplexe Zusammenspiel der inflammatorischen Zellen der Tumormikroumgebung mittels Zytokinproduktion und Überexpression von Zytokinrezeptoren trägt zur Proliferation der HRS, der erfolgreichen Immunevasion und der Aufrechterhaltung einer geeigneten Umgebung zur Tumorprogression bei (Ribatti et al., 2022; Aldinucci et al., 2010). Dabei sezernieren HRS selbst Interleukin (IL) -5, -7, -8, -9, und -13 sowie TGF- $\beta$  und tragen so zur Rekrutierung von Granulozyten, Mastzellen, Lymphozyten und Makrophagen bei. Die Produktion von Zytokinen, wie IL-4, IL-5 und IL-13, wird mit der Anziehung von Plasmazellen und eosinophilen Granulozyten in Verbindung gebracht (Ribatti et al., 2022). Teil der Tumormikroumgebung sind zudem mehrere Subpopulationen von T-Zellen. Hier sind insbesondere im Rahmen einer Entwicklung einer immunsuppressiven Mikroumgebung TH-2 und IL-10 sezernierende Treg Zellen zu erwähnen (Ribatti et al., 2022). Eine wichtige Rolle bei der Induktion der Fibrose sowie der Proliferation der Fibroblasten spielt insbesondere IL-13 und TGF- $\beta$ , wobei beide Zytokine sowohl von HRS Zellen selbst als auch vom Immunstroma beispielsweise durch Mastzellen sezerniert werden können. Dabei korreliert die Anzahl an Mastzellen im NSHL positiv mit der Ausprägung der Fibrose, wobei eine hohe Anzahl an Mastzellen mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (Nakayama et al., 2016; Ribatti et al., 2022). TGF- $\beta$  und IL-10 können zur darüber hinaus direkt zur Fibrose beitragen (Nakayama et al., 2016). Zudem sind eosinophile Granulozyten eine häufige Komponente des NSHL und auch in Gewebeproben der IgG4-assoziierten Erkrankung wird ein leichtes bis moderates eosinophiles Infiltrat beobachtet (Deshpande et al., 2012; Umehara et al., 2012b). Wie in der Einführung ausgeführt, wird bei der Pathogenese der IgG4-assoziierten Erkrankung eine führende Rolle der Th2-, der Tfh2- und der regulatorischen T-Zellen diskutiert, welche die IL-4, IL-5 und IL-13 sowie IL-10 und TGF- $\beta$  sezernieren (Witte, 2016). Die Häufigkeit von IgG4+ Plasmazellen beim NSHL und der IgG4-assoziierten Erkrankung lässt vermuten, dass die immunologische Mikroumgebung bei beiden Erkrankungen ähnlichen Mechanismen unterliegen könnten und verdeutlicht somit das Potential einer Fehldiagnose der IgG4-assoziierten Erkrankung beim NSHL. Darüber hinaus werden auch im Rahmen einer normalen Immunantwort IL 10 und TGF- $\beta$  von follikulären, regulatorischen T-Zellen (Tfr) sezerniert, welche hierdurch im Rahmen einer normalen Immunantwort in Keimzentren nicht nur zum Klassenwechsel zur IgG4 Produktion beitragen, sondern auch eine

wichtige suppressive Rolle in der Keimzentrumsreaktion einzunehmen (Sage und Sharpe, 2015; Ito et al., 2019) scheinen. Das komplexe Zusammenspiel der Signalwege des inerten und erworbenen Immunsystems sind bei beiden Krankheitsbildern von Bedeutung und Gegenstand gegenwärtiger Forschung um mögliche Behandlungsansätze zu finden (Liu und Shipp, 2017). Der Vergleich unterschiedlicher Krankheitsbilder und ihre histologische Präsentation kann dazu beitragen, diese Signalwege auch im Rahmen einer normalen Keimzentrumsreaktion besser zu verstehen.

### 1.5 Zusammenfassung

Zusammenfassend befasste sich diese Studie mit den Konsenskriterien der IgG4-assoziierten Erkrankungen und wandte diese auf Proben mit einem NSHL an, um die Möglichkeit von Fehldiagnosen zu untersuchen. Hierbei wurde gezeigt, dass ähnliche pathologische und immunhistochemische Befunde bei der IgG4-assoziierten Erkrankung und dem NSHL auftreten. Dies unterstreicht die Notwendigkeit, diese völlig unterschiedlich behandelten Erkrankungen mit unterschiedlicher Prognose anhand von morphologischer Begutachtung, immunhistochemischer Untersuchung und Korrelation mit ergänzenden klinischen Informationen zu differenzieren. Insbesondere bei kleinen Lymphknotenbiopsien ist es ratsam, eine Manifestation eines NSHL durch eine immunhistochemische Färbung mit CD30 auszuschließen. Die Ähnlichkeit der immunologischen Mikroumgebung bei beiden Erkrankungen kann helfen, die funktionelle Bedeutung der beteiligten Immunzellen aufzuklären und die Immunantworten vom T-Helfer Typ in vivo besser zu verstehen. Es ist daher von großer Bedeutung bei Verdacht auf eine Manifestation der IgG4-assoziierten Erkrankung in Lymphknoten immer auch das Hodgkin Lymphom auszuschließen. Hierfür sollte eine Zusammenschau von Klinik, histopathologischer Präsentation und Laborwerten sowie eine immunhistochemische Färbung mittels CD30 erfolgen, um maligne Reed-Sternbergzellen auszuschließen.

### 1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Aalberse RC, Schuurman J. IgG4 breaking the rules. *Immunology* 2002; 105: 9–19

Aalberse RC, Stapel SO, Schuurman J, Rispens T. Immunoglobulin G4: an odd antibody. *Clinical & Experimental Allergy* 2009; 39: 469–477

Agaimy A, Ihrler S. Immunglobulin-G4(IgG4)-assoziierte Erkrankung. Gesichertes und Kontroverses der häufigsten Kopf-Hals-Manifestationen. *Der Pathologe* 2014; 35: 152–159

Aldinucci D, Gloghini A, Pinto A, Filippi R de, Carbone A. The classical Hodgkin's lymphoma microenvironment and its role in promoting tumour growth and immune escape. *The Journal of pathology* 2010; 221: 248–263

Bledsoe JR, Della-Torre E, Rovati L, Deshpande V. IgG4-related disease: review of the histopathologic features, differential diagnosis, and therapeutic approach. *APMIS* 2018; 126: 459–476

Chen LYC, Mattman A, Seidman MA, Carruthers MN. IgG4-related disease: what a hematologist needs to know. *Haematologica* 2019; 104: 444–455

Cheuk W, Chan JKC. Lymphadenopathy of IgG4-related disease: an underdiagnosed and overdiagnosed entity. *Seminars in diagnostic pathology* 2012; 29: 226–234

Deshpande V, Gupta R, Sainani N, Sahani DV, Virk R, Ferrone C, Khosroshahi A, Stone JH, Lauwers GY. Subclassification of autoimmune pancreatitis: a histologic classification with clinical significance. *The American journal of surgical pathology* 2011; 35: 26–35

Deshpande V, Zen Y, Chan JK, Yi EE, Sato Y, Yoshino T, Klöppel G, Heathcote JG, Khosroshahi A, Ferry JA, Aalberse RC, Bloch DB, Brugge WR, Bateman AC, Carruthers MN, Chari ST, Cheuk W, Cornell LD, Fernandez-Del Castillo C, Forcione DG, Hamilos DL, Kamisawa T, Kasashima S, Kawa S, Kawano M, Lauwers GY, Masaki Y, Nakanuma Y, Notohara K, Okazaki K, Ryu JK, Saeki T, Sahani DV, Smyrk TC, Stone JR, Takahira M, Webster GJ, Yamamoto M, Zamboni G, Umehara H, Stone JH. Consensus

statement on the pathology of IgG4-related disease. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2012; 25: 1181–1192

Detlefsen S, Klöppel G. IgG4-related disease: with emphasis on the biopsy diagnosis of autoimmune pancreatitis and sclerosing cholangitis. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 2018; 472: 545–556

Ewing DE, Hammer RD. IgG4-related disease simulating Hodgkin lymphoma in a child. *Human Pathology: Case Reports* 2016; 4: 42–45

Ferry JA. IgG4-related lymphadenopathy and IgG4-related lymphoma: moving targets. *Diagnostic Histopathology* 2013; 19: 128–139

Hsi ED, Li H, Nixon AB, Schöder H, Bartlett NL, LeBlanc M, Smith S, Kahl BS, Leonard JP, Evens AM, Scott DW, Rimsza LM, Friedberg JW. Serum levels of TARC, MDC, IL-10, and soluble CD163 in Hodgkin lymphoma: a SWOG S0816 correlative study. *Blood* 2019; 133: 1762–1765

Hsieh S-C, Shen C-Y, Liao H-T, Chen M-H, Wu C-H, Li K-J, Lu C-S, Kuo Y-M, Tsai H-C, Tsai C-Y, Yu C-L. The Cellular and Molecular Bases of Allergy, Inflammation and Tissue Fibrosis in Patients with IgG4-related Disease. *International Journal of Molecular Sciences* 2020; 21

Ito F, Kamekura R, Yamamoto M, Takano K, Takaki H, Yabe H, Ikegami I, Shigehara K, Himi T, Takahashi H, Ichimiya S. IL-10+ T follicular regulatory cells are associated with the pathogenesis of IgG4-related disease. *Immunology letters* 2019; 207: 56–63

Kamisawa T. Immunoglobulin G4-related Disease: A New Systemic Disease Emerging in Japan. *JMA journal* 2022; 5: 23–35

Kamisawa T, Funata N, Hayashi Y, Eishi Y, Koike M, Tsuruta K, Okamoto A, Egawa N, Nakajima H. A new clinicopathological entity of IgG4-related autoimmune disease. *Journal of gastroenterology* 2003; 38: 982–984

Khristi J, Mey U, Kirfel J, Schmidt-Wolf IGH, Gütgemann I. Sequential Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma in non-immunocompromised patients. *Annals of hematology* 2013; 92: 1565–1567

Kiil K, Bein J, Schuhmacher B, Thurner L, Schneider M, Hansmann M-L, Hartmann S. A high number of IgG4-positive plasma cells rules out nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 2018; 473: 759–764

Kleger A, Seufferlein T, Wagner M, Tannapfel A, Hoffmann TK, Mayerle J. IgG4-related autoimmune diseases: Polymorphous presentation complicates diagnosis and treatment. *Deutsches Arzteblatt international* 2015; 112: 128–135

Koneczny I. Update on IgG4-mediated autoimmune diseases: New insights and new family members. *Autoimmunity reviews* 2020; 19: 102646

Küppers R. Molecular biology of Hodgkin lymphoma. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program* 2009: 491–496

Liu WR, Shipp MA. Signaling pathways and immune evasion mechanisms in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2017; 130: 2265–2270

Maritati F, Peyronel F, Vaglio A. IgG4-related disease: a clinical perspective. *Rheumatology (Oxford, England)* 2020; 59: iii123-iii131

Martinez LL, Friedländer E, van der Laak JAWM, Hebeda KM. Abundance of IgG4+ plasma cells in isolated reactive lymphadenopathy is no indication of IgG4-related disease. *American journal of clinical pathology* 2014; 142: 459–466

Maslinska M, Dmowska-Chalaba J, Jakubaszek M. The Role of IgG4 in Autoimmunity and Rheumatic Diseases. *Frontiers in immunology* 2021; 12: 787422

Michailidou D, Schwartz DM, Mustelin T, Hughes GC. Allergic Aspects of IgG4-Related Disease: Implications for Pathogenesis and Therapy. *Frontiers in immunology* 2021; 12: 693192

Nakayama S, Yokote T, Hiraoka N, Nishiwaki U, Hanafusa T, Nishimura Y, Tsuji M. Role of mast cells in fibrosis of classical Hodgkin lymphoma. *International journal of immunopathology and pharmacology* 2016; 29: 603–611

Nowak V, Agaimy A, Kristiansen G, Gütgemann I. Increased IgG4-positive plasma cells in nodular-sclerosing Hodgkin lymphoma: a diagnostic pitfall. *Histopathology* 2020; 76: 244–250

Ribatti D, Tamma R, Annese T, Ingravallo G, Specchia G. Inflammatory microenvironment in classical Hodgkin's lymphoma with special stress on mast cells. *Frontiers in oncology* 2022; 12: 964573

Sage PT, Sharpe AH. T follicular regulatory cells in the regulation of B cell responses. *Trends in immunology* 2015; 36: 410–418

Sato Y, Inoue D, Asano N, Takata K, Asaoku H, Maeda Y, Morito T, Okumura H, Ishizawa S, Matsui S, Miyazono T, Takeuchi T, Kuroda N, Orita Y, Takagawa K, Kojima M, Yoshino T. Association between IgG4-related disease and progressively transformed germinal centers of lymph nodes. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2012; 25: 956–967

Stone JH, Brito-Zerón P, Bosch X, Ramos-Casals M. Diagnostic Approach to the Complexity of IgG4-Related Disease. *Mayo Clinic proceedings* 2015; 90: 927–939

Strehl JD, Hartmann A, Agaimy A. Numerous IgG4-positive plasma cells are ubiquitous in diverse localised non-specific chronic inflammatory conditions and need to be distinguished from IgG4-related systemic disorders. *Journal of clinical pathology* 2011; 64: 237–243

Tian W, Yakirevich E, Matoso A, Gnepp DR. IgG4(+) plasma cells in sclerosing variant of mucoepidermoid carcinoma. *The American journal of surgical pathology* 2012; 36: 973–979

Umehara H, Okazaki K, Masaki Y, Kawano M, Yamamoto M, Saeki T, Matsui S, Sumida T, Mimori T, Tanaka Y, Tsubota K, Yoshino T, Kawa S, Suzuki R, Takegami T, Tomosugi N, Kurose N, Ishigaki Y, Azumi A, Kojima M, Nakamura S, Inoue D. A novel clinical entity, IgG4-related disease (IgG4RD): general concept and details. *Modern rheumatology* 2012a; 22: 1–14

Umehara H, Okazaki K, Masaki Y, Kawano M, Yamamoto M, Saeki T, Matsui S, Yoshino T, Nakamura S, Kawa S, Hamano H, Kamisawa T, Shimosegawa T, Shimatsu A, Nakamura S, Ito T, Notohara K, Sumida T, Tanaka Y, Mimori T, Chiba T, Mishima M, Hibi T, Tsubouchi H, Inui K, Ohara H. Comprehensive diagnostic criteria for IgG4-related disease (IgG4-RD), 2011. *Modern rheumatology* 2012b; 22: 21–30

van der Neut Kolfshoten M, Schuurman J, Losen M, Bleeker WK, Martínez-Martínez P, Vermeulen E, Bleker TH den, Wiegman L, Vink T, Aarden LA, Baets MH de, van de Winkel JGJ, Aalberse RC, Parren PWHI. Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange. *Science (New York, N.Y.)* 2007; 317: 1554–1557

Vardhana S, Younes A. The immune microenvironment in Hodgkin lymphoma: T cells, B cells, and immune checkpoints. *Haematologica* 2016; 101: 794–802

Wang H-W, Balakrishna JP, Pittaluga S, Jaffe ES. Diagnosis of Hodgkin lymphoma in the modern era. *British journal of haematology* 2018

Witte T. Immunologische Grundlagen der IgG4-RD. *Radiologe* 2016; 56: 1043–1048

Yamamoto M, Takano K-I, Kamekura R, Aochi S, Suzuki C, Ichimiya S, Nakase H, Himi T, Takahashi H. Interleukin 5-producing ST2+ memory Th2 cells in IgG4-related dacryoadenitis and sialadenitis. *Modern rheumatology* 2019; 29: 856–860

Zen Y, Fujii T, Harada K, Kawano M, Yamada K, Takahira M, Nakanuma Y. Th2 and regulatory immune reactions are increased in immunoglobulin G4-related sclerosing pancreatitis and cholangitis. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 2007; 45: 1538–1546

Zenggang Pan JZ. IgG4-related lymphadenopathy: a potentially under-and over-diagnosed entity. *Journal of Clinical and Experimental Pathology* 2017: 10153–10166



## 2. Veröffentlichung

This is the peer reviewed version of the following article: „Increased IgG4-positive plasma cells in nodular-sclerosing Hodgkin lymphoma: a diagnostic pitfall” which has been published in final form at <https://doi.org/10.1111/his.13965>. This article may be used for non-commercial purposes in accordance with Wiley Terms and Conditions for Self-Archiving.

### **Increased IgG4-positive plasma cells in nodular-sclerosing Hodgkin lymphoma: a diagnostic pitfall**

V Nowak,<sup>1</sup> A Agaimy,<sup>2</sup> G Kristiansen<sup>1</sup> & I Gütgemann<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Pathology, Rheinische Friedrich-Wilhelm University, University Hospital Bonn, and*

<sup>2</sup>*Institute of Pathology, Friedrich-Alexander University Nuremberg-Erlangen, University Hospital Erlangen, Germany*

Short title: IgG4-positive plasma cells in nodular-sclerosing Hodgkin lymphoma

Keywords: IgG4-related disease, Hodgkin lymphoma, IgG4/IgG ratio, nodular-sclerosing Hodgkin lymphoma

*Aims:* Despite increasing interest in the recently established immunoglobulin 4-related disease (IgG4-RD), its pathogenesis and aetiology remain largely unclear. Characteristic histopathological features are one of the key elements of diagnosis, including ‘storiform’ fibrosis, obliterative phlebitis, increased lymphoplasmacytic infiltration and increased levels of IgG4 in serum and tissue. Histopathological features of IgG4-RD are striking but not specific, and can pose a pitfall for surgical pathologists. This paper aims to determine the actual amount of IgG4+ plasma cells in

nodular-sclerosing Hodgkin lymphoma (NSHL) and its potential to be misdiagnosed in routine clinical practice.

*Methods and results:* : IgG4+ plasma cells per high-power field (HPF) and the ratio of IgG4+ versus IgG+ plasma cells (IgG4/IgG ratio) in lymph node biopsies of 24 patients with nodular-sclerosing Hodgkin lymphoma (NSHL) were determined using immunohistochemistry and consensus scoring criteria as used for IgG4-RD. Ten lymph node biopsies with reactive follicular hyperplasia were assessed for comparison. Higher numbers of IgG4+ plasma cells ( $P < 0.001$ ) were observed in NSHL versus follicular hyperplasia (mean 34 versus 8 per HPF) with a mean IgG4/IgG ratio of 0.38 versus 0.18. Five cases (21%) fulfilled the consensus criteria of IgG4-RD, with  $> 50$  IgG4+ plasma cells per HPF and an IgG4/IgG ratio of  $> 0.4$ . The mean count of IgG4+ plasma cells per HPF in NSHL varied greatly (3–88) with increased numbers of IgG4+ plasma cells seen near areas of fibrosclerosis.

*Conclusions:* Significantly higher levels of IgG4+ plasma cells are common in NSHL, emphasising the need to exclude Reed–Sternberg cells by morphology and immunohistochemistry in biopsies where IgG4-RD is suspected.

## **Introduction**

IgG4-related disease (IgG4-RD) is a recently established usually systemic, tumefactive fibro-inflammatory disease<sup>1</sup> associated with storiform fibrosis, obliterative phlebitis and a rich lymphoplasmacytic infiltrate with elevated levels of IgG4 in both tissue and serum.<sup>2</sup> Various organs may be simultaneously or metachronously affected, chief among them being the hepatobiliary duct, the pancreas and the head and neck, including salivary and lacrimal glands. However, most organ systems, including thyroid, lungs, lymph nodes, liver and kidney, have been described as potential locations.<sup>3</sup> Concomitant lymphadenopathy is common.<sup>4</sup> Current diagnostic criteria include an

obligatory histopathological examination of at least one lesion, with an elevated IgG4/IgG ratio of more than 0.4 being considered relatively specific.<sup>4</sup> However, the number of IgG4+ plasma cells needed for cut-off depends on the organ affected and biopsy type (core versus excision), ranging from 10/high-power field (HPF) (meninges) to 200/HPF (skin).<sup>5</sup> Elevated serum levels of IgG4 (> 135 mg/dl) have proved to be sensitive but somewhat non-specific.<sup>6,7</sup> Deshpande *et al.*<sup>5</sup> proposed a mandatory IgG4/IgG ratio of > 0.4 plus a cut-off of > 50 or 100 IgG4+ plasma cells per HPF, depending on the presence of one or two major histological features. A three-tiered diagnostic terminology has been proposed, including the categories ‘histologically highly suggestive for IgG4-RD’, ‘probable histological features of IgG4-RD and ‘insufficient histopathological evidence of IgG4-RD’; however, clear categories in lymph nodes are still in debate.<sup>5,8</sup>

Various histological patterns in IgG4-RD lymphadenopathy have been observed previously, reviewed by Ferry *et al.*, all of which include increased IgG4+ plasma cells: the Castleman disease-like pattern, follicular hyperplasia pattern, interfollicular expansion pattern, progressive transformation of germinal centre-like pattern and inflammatory pseudo-tumour-like pattern.<sup>9</sup>

Classical Hodgkin lymphoma (HL) is usually characterised by a tumour microenvironment of a mixed inflammatory cellular background surrounding malignant Hodgkin and Reed–Sternberg (HRS) cells and varying degrees of sclerosis. It can be generally categorised into four subtypes: nodular-sclerosing (NSHL), lymphocyte-rich, mixed cellularity and lymphocyte-depleted. Diagnosis is usually made morphologically and by immunostaining, with the most frequent markers being CD30 and CD15 to identify malignant cells.<sup>10</sup> HRS cells are considered to be of germinal B cell origin but lacking B cell phenotype, having lost their typical CD19 and CD20 positivity.

Because of single case observations of NSHL being misinterpreted as sclerosing IgG4-related mediastinitis by submitting pathologists, we undertook this study to address the pattern and distribution of IgG4+ plasma cells in NSHL, as sclerosis is most pronounced here, and thus by morphology

alone NSHL can be mistaken for IgG4-RD, especially in small lymph node or soft tissue biopsies, with a dense lymphoplasmacytic infiltrate.

Although malignant lymphomas have been mentioned in the differential diagnosis of IgG4-RD,<sup>11</sup> to our knowledge no comprehensive study has assessed and compared the frequency of IgG4+ plasma cells and IgG4/IgG ratios in NSHL compared to IgG4-RD.

## **Methods**

### **PATIENT COHORT**

Formalin-fixed, paraffin-embedded excisional biopsy tissue samples of lymph nodes from a population of patients with an initial diagnosis of NSHL and no clinical evidence of IgG4-RD between 2009 and 2018 were retrieved from the archive of the Department of Pathology, University Hospital Bonn. Permission from the University's ethics board was acquired prior to the study (no. 236, 10/2018). The patients' age ranged from 11 to 70 years (mean age = 31 years), and the study population comprised 10 males and 14 females. In addition, 10 specimens from solitary reactive lymphadenopathy with a pattern of follicular hyperplasia without clinical or microscopic evidence of specific infection or neoplasia were selected. The cohort included four men and six women, with ages ranging from 8 to 63 years (mean age = 17 years). All specimens measured at least 1 cm in diameter.

### **HISTOLOGY AND IMMUNOHISTOCHEMISTRY (IHC)**

Slides were stained with standard haematoxylin and eosin (H&E) staining to assess microscopic morphology. For IHC staining, standard paraffin sections (2–3 µm) were placed in 200 ml of target retrieval solution (citrate buffer pH 6.0), heated for 20 min at 100°C, and then washed with Tris-buffered saline. Endogenous peroxidase was blocked using hydrogen peroxide. Primary antibody

staining was performed using monoclonal antibodies directed against IgG4 (Acris, SM2069P; dilution = 1:250, pretreatment = 0.1% protease), IgG (Agilent, A 0423; dilution = 1:30 000, pretreatment = 0.01% protease) and CD30 (Ber-H2, Roche; prediluted). The diaminobenzidine (DAB) IHC Detection Kit and a semi-automatic immunohistochemistry stainer (Autostainer 480S; Medac, Germany) were used for counterstaining and development for IgG4 and IgG staining, and the Ventana Opti-View System (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) for CD30 staining. Photomicrographs were captured using a BX51 microscope (Olympus, Hamburg, Germany) equipped with a Zeiss AxioCam MRc5 camera and the Axiovision imaging software (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

## SCORING

IgG4+ plasma cells were quantified by counting three HPFs in 'hot-spot' areas with the most abundant IgG4+ plasma cells and subsequently IgG+ plasma cells in adjacent serial sections, calculating the mean and median. One HPF corresponded to an area of 0.22 mm<sup>2</sup>, using a ×40 objective lens and a ×10 eyepiece. The mean was used to determine the IgG4/IgG ratio, according to international consensus criteria for IgG4-RD.<sup>5</sup> IgG4+ plasma cells were considered as increased when > 50 IgG4+ plasma cells/HPF were observed. An IgG4/IgG ratio of > 0.4, expressed as the percentage of IgG4 expressing plasma cells of all IgG expressing plasma cells, was considered as elevated, as suggested in the consensus statement on the pathology of IgG4-RD.<sup>5</sup>

## STATISTICAL ANALYSIS

Statistical analysis was performed using the IBM SPSS (Chicago, IL, USA) software package for Windows (version 25.0) and Microsoft Office Excel 2007. *P*-values < 0.05 were considered

statistically significant. The Mann–Whitney *U*-test was performed to compare the quantity of IgG4+ plasma cells and the IgG4/IgG ratio in NSHL and reactive lymphadenopathy.

## Results

Ten reactive lymph node biopsies showing follicular hyperplasia and 24 cases of NSHL were examined with IgG4 and IgG immunohistochemical staining to determine the frequency of IgG4+ plasma cells and calculate the IgG4/IgG ratio in tissue sections. Results and clinical data are summarised in Tables 1 and 2.

### NSHL

A total of 24 lymph nodes from patients diagnosed with NSHL and no clinical evidence of IgG4-RD were examined (Table 1). A mean number of IgG4+ plasma cells [34; median = 28; 95% confidence interval (CI) = 24–43 IgG4+ plasma cells per HPF; range = 3–88] was observed. Five cases (21%) complied with the criteria of increased IgG4+ plasma cells, with > 50 IgG4+ plasma cells and a IgG4/IgG ratio > 0.4, thus fitting the ‘probable’ diagnosis consensus criteria for IgG4-RD (Table 1, Figures 1 and 2).<sup>5</sup> None met the stricter criteria of > 100 IgG4+ plasma cells, as suggested for the diagnosis of IgG4-RD in lymph nodes.<sup>9</sup>

An overall IgG4/IgG ratio of 0.38 (median = 0.37; CI = 0.3–0.45 IgG4/IgG ratio; range = 0.06–0.78) was observed in NSHL. Notably, IgG4+ plasma cells showed a somewhat non-homogeneous distribution, with loose clusters near areas with increased collagen fibrosis (Figure 3). There were no differences between male and female patients or differences with regard to age.

### REACTIVE LYMPHADENOPATHY

Solitary lymphadenopathies with follicular hyperplasia pattern, excised because of clinical suspicion of lymphoma, were used as a control cohort (Table 2).

A mean of eight IgG4+ plasma cells per HPF (median = 7; CI = 6–11 IgG4+ plasma cells per HPF; range = 3–15) was observed in these lymph nodes, with IgG4+ plasma cells being more frequent within the paracortex than within germinal centres. A mean IgG4/IgG ratio of 0.18 (median = 0.15; CI = 0.1–0.26; range = 0.02–0.44) was determined (Figures 1 and 2).

## COMPARISON

The Mann–Whitney *U*-test was performed for statistical comparison of the average IgG4+ plasma cell frequency in NSHL versus follicular hyperplasia (Figure 1). The mean number of IgG4+ plasma cells/HPF in NSHL was statistically higher than in reactive lymph nodes with follicular hyperplasia (34/HPF versus eight/HPF;  $P < 0.001$ ). In addition, the mean IgG4/IgG ratio in NSHL was significantly higher than in reactive follicular hyperplasia (0.38 versus 0.18;  $P = 0.007$ ) (Figure 2).

## Discussion

The presence of a variable degree of storiform fibrosclerosis in conjunction with lymphoplasmacytic infiltrates and increased numbers of IgG4+ plasma cells and an increase of the ratio of IgG4/IgG expressing plasma cells (in excess of 0.4) represent key features in the diagnosis of IgG4-RD.<sup>5,9</sup> Given the observation that increased IgG4+ plasma cells are ubiquitous in diverse chronic inflammatory lesions, the additional presence of fibrosclerosis may complicate the differential diagnostic work-up of such lesions,<sup>12</sup> with IgG4-RD representing one of the major differential diagnostic considerations.

In this study, we show that NSHL presents an important diagnostic pitfall, especially when a mixed lymphocyte and plasma cell-rich inflammatory infiltrate is observed with elevated IgG4+ plasma cells in a background of fibrosis, thus mimicking IgG4-RD. This finding is of utmost clinical importance with respect to adequate treatment.

In lymph nodes, the presence of more than one histopathological criterion in combination with  $> 50$  IgG4+ plasma cells allows a diagnosis of 'probable histological features of IgG4-RD', according to international consensus criteria.<sup>5</sup> In five of 24 cases of NSHL in our study, hot-spot areas with a mean of  $> 50$  IgG4+ plasma cells per HPF were identified and the IgG4/IgG ratio was  $> 0.4$ . No case exceeded a mean of  $> 100$  IgG4+ plasma cells. The quantity of IgG4+ plasma cells in NSHL varied greatly (from only one/HPF to  $> 100$ /HPF), indicating a high variability from case to case and heterogeneous distribution within one tissue section.

The functional role of IgG4+ plasma cells as part of the spectrum of chronic inflammatory reactions in lymph nodes remains to be elucidated. Elevated absolute levels of IgG4+ plasma cells alone are not specific for IgG4-RD; however, here they regularly exceed that of a non-specific inflammatory background.<sup>13</sup>

Our study shows that the histopathological parameters and characteristics required for the diagnosis of IgG4-RD are frequently matched in lymph node manifestations of NSHL. This emphasises the need to carefully rule out the presence of HRS cells in such biopsies and to correlate the findings with clinical and radiological information. In particular, solitary reactive lymph nodes without clinical symptoms for IgG4-RD may display elevated IgG4+ plasma cell counts, so thresholds and cut-off values should be judged with caution.<sup>5,13</sup> In a recent consensus statement a minimum of 100 IgG4+ plasma cells in lymph nodes has been suggested to increase specificity.<sup>4,9</sup> Taking into consideration that none of our cases met this criterion, stricter criteria may improve the specificity of diagnosing IgG4-RD; however, intermediate frequencies may still indicate the probability of IgG4-



RD, depending on the clinical setting. Our results suggest that especially when less strict criteria are used in lymph node biopsies with suspected IgG4-RD, careful microscopic evaluation and IHC using anti-CD30 is advisable to rule out NSHL.

Single case reports in children exist of IgG4-RD mimicking HL.<sup>14</sup> Interestingly, in this case, laboratory studies demonstrated increased IgG4 and IgE with an elevation of serum IgG4/IgG ratio. Histologically, follicular hyperplasia with progressive transformation of germinal centres and interfollicular increase of eosinophils, fibrosis and large CD30-positive cells, as well as IgG4+ plasma cells, were observed, indicating a potential diagnostic problem distinguishing HL from IgG4-RD and, possibly, also Castleman's disease in the paediatric age group.<sup>8</sup>

Interestingly, an abundance of IgG4+ plasma cells seems to be of use to distinguish between nodular, lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma (NLPHL) and progressively transformed germinal centres (PTGC), with IgG4+ plasma cells being sparse in NLPHL.<sup>15</sup> This is important, as early stages of NPHL and PTGC display a morphologically similar pattern of nodal growth and dense B cell infiltrates. Moreover, PTGC has been highly associated with elevated numbers of IgG4+ plasma cells and is a possible pattern of manifestation in IgG4-RD.<sup>15,16</sup>

Of all histomorphological patterns described in lymph node IgG4-RD,<sup>8,9</sup> the inflammatory pseudotumour-like type mainly resembles the histopathological manifestation of Hodgkin lymphoma, including focal fibrosclerosis and a mixed infiltrate of lymphocytes, plasma cells and eosinophils.<sup>8,9</sup> Interestingly, in our study, aggregates of IgG4+ plasma cells were frequently observed near areas of sclerosis. In contrast, in IgG4-RD IgG4+ plasma cells are mainly distributed in a diffuse pattern. In future, the distribution pattern of IgG4+ plasma cells in HL, Castleman's disease and IgG4-RD and the frequency of other inflammatory cells and production of profibrotic cytokines such as transforming growth factor (TGF)- $\beta$  and interleukin (IL)-10 may be important to unravel the biological role of IgG4+ plasma cells in these diseases, and to assess whether the distribution pattern of IgG4+

plasma cells may be a distinctive feature of IgG4-RD versus other conditions. A role for IgG4+ plasma cells has been suggested as an explanation for the prominent sclerosis seen specifically in some neoplasms associated with prominent inflammation, such as mucoepidermoid carcinoma.<sup>17</sup> The abundance of IgG4+ plasma cells in NSHL and IgG4-RD suggests that the immunological microenvironment in both diseases may be similar. The exact mechanism in NSHL allowing HRS cells to escape the patient's own immune system remains unknown.<sup>18</sup> Production of cytokines, such as IL-4, IL-5 and IL-13, have been implicated to cause attraction of plasma cells and eosinophils and TGF- $\beta$  and IL-10 may contribute to fibrosis.<sup>19</sup> While eosinophils are a common component in NSHL, mild to moderate eosinophilic infiltrate is also observed in tissue samples of IgG4-RD,<sup>5,7</sup> making the misdiagnosis of IgG4-RD in cases of NSHL more likely.

In conclusion, this study demonstrates that similar pathological and immunohistochemical findings are shared by IgG4-RD and NSHL. This emphasises the need to differentiate these diseases, that are treated entirely differently, using standard morphology, immunohistochemical and adjunct clinical information. In particular, in small lymph node biopsies it is advisable to rule out a manifestation of NSHL by CD30 IHC staining. The similarity of the immunological microenvironment in both diseases may aid in elucidating the functional relevance of the immune cells involved and to understand more clearly T helper type immune responses *in vivo*.

### **Acknowledgements**

We thank S. Steiner for technical assistance.

### **Conflicts of interest**

The authors declare no conflicts of interest.

## References

1. Kamisawa T, Funata N, Hayashi Y *et al.* A new clinicopathological entity of IgG4-related autoimmune disease. *J. Gastroenterol.* 2003; **38**; 982–984.
2. Deshpande V, Gupta R, Sainani N *et al.* Subclassification of autoimmune pancreatitis: a histologic classification with clinical significance. *Am. J. Surg. Pathol.* 2011; **35**; 26–35.
3. Detlefsen S, Klöppel G. IgG4-related disease: with emphasis on the biopsy diagnosis of autoimmune pancreatitis and sclerosing cholangitis. *Virchows Arch.* 2018; **472**; 545–556.
4. Cheuk W, Chan JKC. Lymphadenopathy of IgG4-related disease: an underdiagnosed and overdiagnosed entity. *Semin. Diagn. Pathol.* 2012; **29**; 226–234.
5. Deshpande V, Zen Y, Chan JK *et al.* Consensus statement on the pathology of IgG4-related disease. *Mod. Pathol.* 2012; **25**; 1181–192.
6. Agaimy A, Ihrler S. Immunglobulin-G4(IgG4)-assoziierte Erkrankung. Gesichertes und Kontroverses der häufigsten Kopf-Hals-Manifestationen. *Pathologe* 2014; **35**; 152–159.
7. Umehara H, Okazaki K, Masaki Y *et al.* Comprehensive diagnostic criteria for IgG4-related disease (IgG4-RD), 2011. *Mod. Rheumatol.* 2012; **22**; 21–30.
8. Zenggang Pan JZ. IgG4-related lymphadenopathy: a potentially under-and over-diagnosed entity. *J. Clin. Exp. Pathol.* 2017; **10**; 10153–10166.
9. Ferry JA. IgG4-related lymphadenopathy and IgG4-related lymphoma: moving targets. *Diagn. Histopathol.* 2013; **19**; 128–139.
10. Wang H-W, Balakrishna JP, Pittaluga S, Jaffe ES. Diagnosis of Hodgkin lymphoma in the modern era. *Br. J. Haematol.* 2019; **184**; 45–59.
11. Stone JH, Brito-Zerón P, Bosch X, Ramos-Casals M. Diagnostic approach to the complexity of IgG4-related disease. *Mayo Clin. Proc.* 2015; **90**; 927–939.

12. Strehl JD, Hartmann A, Agaimy A. Numerous IgG4-positive plasma cells are ubiquitous in diverse localised non-specific chronic inflammatory conditions and need to be distinguished from IgG4-related systemic disorders. *J. Clin. Pathol.* 2011; **64**; 237–243.
13. Martinez LL, Friedländer E, van der Laak JAWM, Hebeda KM. Abundance of IgG4+ plasma cells in isolated reactive lymphadenopathy is no indication of IgG4-related disease. *Am J Clin Pathol* 2014; **142**; 459–466.
14. Ewing DE, Hammer RD. IgG4-related disease simulating Hodgkin lymphoma in a child. *Hum. Pathol. Case Rep.* 2016; **4**; 42–45.
15. Kiil K, Bein J, Schuhmacher B, Thurner L *et al.* A high number of IgG4-positive plasma cells rules out nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma. *Virchows Arch.* 2018; **473**; 759–764.
16. Sato Y, Inoue D, Asano N *et al.* Association between IgG4-related disease and progressively transformed germinal centers of lymph nodes. *Mod. Pathol.* 2012; **25**; 956–967.
17. Tian W, Yakirevich E, Matoso A, Gnepp DR. IgG4(+) plasma cells in sclerosing variant of mucoepidermoid carcinoma. *Am. J. Surg. Pathol.* 2012; **36**; 973–979.
18. Vardhana S, Younes A. The immune microenvironment in Hodgkin lymphoma: T cells, B cells, and immune checkpoints. *Haematologica* 2016; **101**; 794–802.
19. Nakayama S, Yokote T, Hiraoka N *et al.* Role of mast cells in fibrosis of classical Hodgkin lymphoma. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 2016; **29**; 603–611.

## Tables and Figures

Table 1

Patient	Age	Sex	Lymph node localization	Mean IgG4+/hpf	SD** IgG4+/hpf	IgG4/IgG (%)
1	27	f	subclavicular	44	4	50
2	22	f	supraclavicular	21	3	39
3	10.5	m	mediastinal	32	6	64
4	53	m	supraclavicular	72	18	40
5	54	m	axillar	27	1	31
6	14	f	supraclavicular	15	3	19
7	15	f	supraclavicular	17	3	26
8	34	f	inguinal	20	1	29
9	63	m	cervical	72	6	45
10	18	m	cervical	56	6	78
11	16	m	supraclavicular	51	2	53
12	20	f	subclavicular	29	3	34
13	42	m	cervical	28	2	ND*
14	24	f	supraclavicular	51	7	ND*
15	14	m	supraclavicular	44	6	66
16	23	f	cervical/ supraclavicular	12	1	28
17	41	m	supraclavicular	12	2	47
18	42	f	cervical	46	2	50
19	70	f	cervical	20	1	21
20	14	f	cervical	88	11	66
21	40	f	supraclavicular	6	1	8
22	12	f	supraclavicular	3	3	9
23	27	f	cervical	19	2	6
24	54	m	mediastinal	17	3	26

**Table 2**

<b>Patient</b>	<b>Age</b>	<b>Sex</b>	<b>Lymph node localization</b>	<b>Mean IgG4/hpf</b>	<b>SD** IgG4/hpf</b>	<b>IgG4/IgG (%)</b>
1	8	m	submandibular	15	3	44
2	12	f	cervical	3	1	7
3	14	f	cervical	6	1	8
4	9	f	cervical	8	3	18
5	11	m	preauricular	5	2	29
6	11	m	buccal	10	2	19
7	14	f	cervical	12	1	2
8	11	f	cervical	14	10	30
9	63	f	cervical	3	1	9
10	15	m	cervical	3	1	12

Figure 1

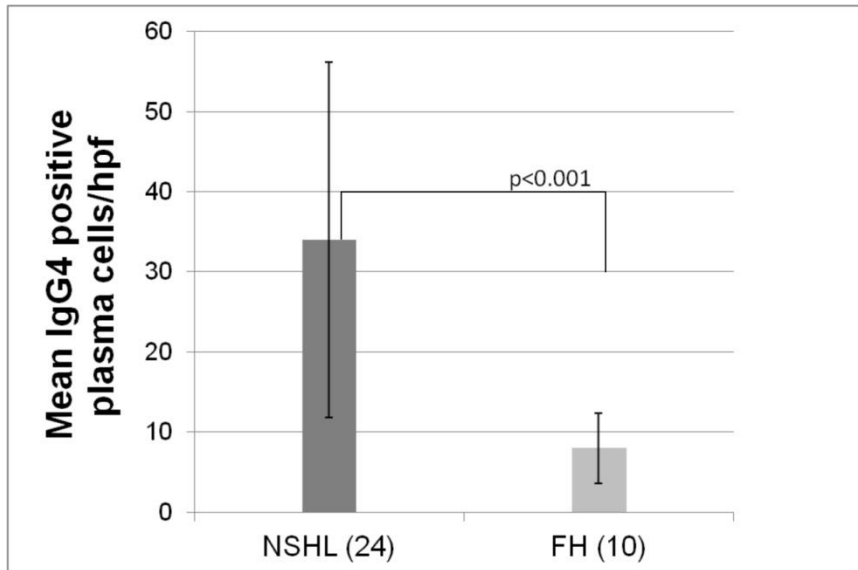
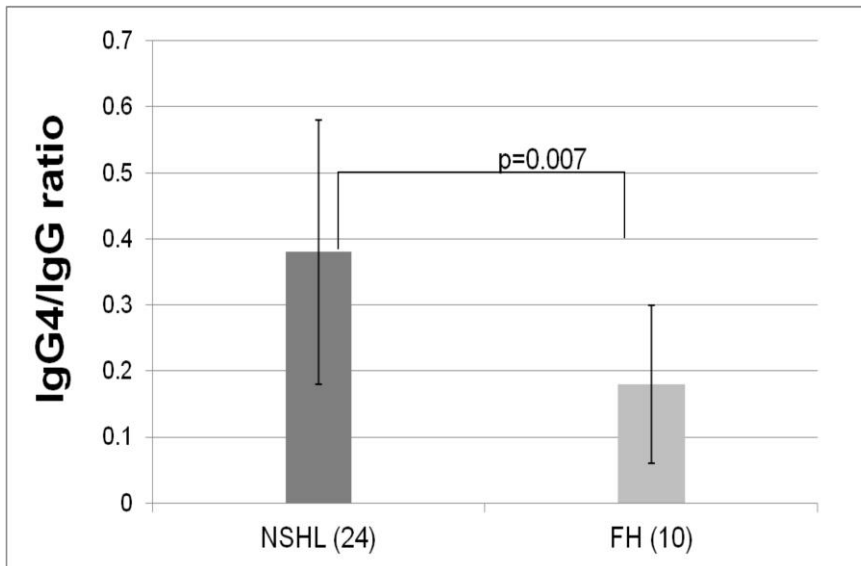
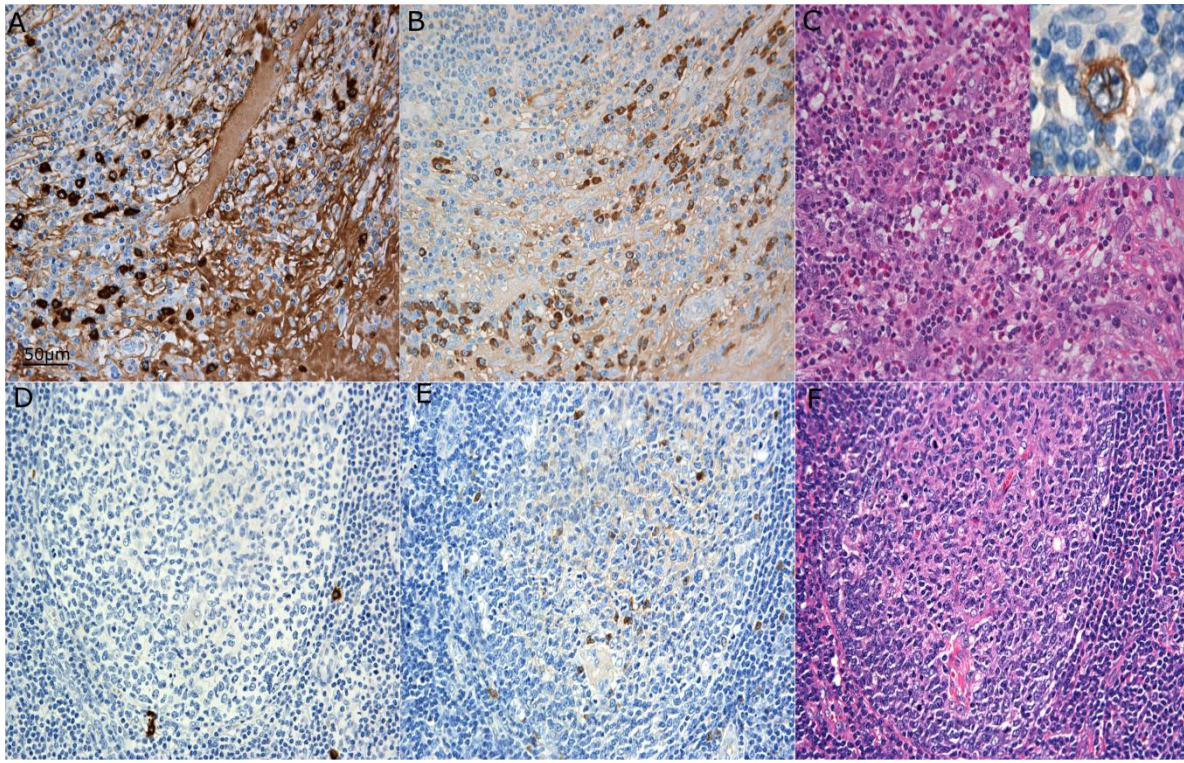


Figure 2



**Figure 3****Legends:****Table 1**

Nodular- sclerosing Hodgkin lymphoma (NSHL). Clinicopathologic data, number of IgG4+ plasma cells (mean/hpf) and IgG4/IgG ratio in %. ND\* not determined (no IgG expressing plasma cells detectable). SD\*\* standard deviation.

**Table 2**

Solitary reactive lymphadenopathy, follicular hyperplasia pattern (FH). Clinicopathologic data, number of IgG4+ plasma cells (mean/hpf) and IgG4/IgG ratio in %. All lymph nodes showed reactive follicular hyperplasia pattern. SD\*\* standard deviation.

**Figure 1**



Immunoglobulin (Ig)G4+ plasma cells per high-power field (HPF) (mean) are increased in nodular-sclerosing Hodgkin lymphoma versus reactive lymphadenopathy, follicular hyperplasia (FH) pattern. Total case numbers in parentheses (*P*-values, Mann–Whitney *U*-test). Error bars indicate standard deviation.

### Figure 2

The immunoglobulin (Ig)G4/IgG ratio is increased in nodular-sclerosing Hodgkin lymphoma (NSHL) versus reactive lymphadenopathy, follicular hyperplasia pattern (FH). Total case numbers in parentheses (*P*-values, Mann–Whitney *U*-test). Error bars indicate standard deviation.

### Figure 3

Immunoglobulin (Ig)G4 (**A**), IgG (**B**) immunohistochemistry (IHC) staining and corresponding haematoxylin and eosin (H&E) morphology (IgG4 and CD30 expression (**C**, insert) in NSHL showing increased IgG4+ plasma cells in areas of sclerosis. IgG4 (**D**) and IgG (**E**) IHC staining with corresponding H&E (**F**) morphology in a reactive lymph node with follicular hyperplasia pattern. Scale bar represents 50  $\mu$ m.

### **3. Danksagung**

Ich möchte mich herzlich bei allen Menschen bedanken, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit geholfen haben.

Insbesondere danke ich meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Ines Gütgemann für die Betreuung und die wertvolle und geduldige Unterstützung.

Außerdem danke ich allen Mitarbeitenden des Instituts für Pathologie Bonn für die stete Hilfsbereitschaft sowie die gute Arbeitsatmosphäre. Danke hier insbesondere an Frau Steiner.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie für ihre Unterstützung während meines Studiums in allen Lebenslagen und zu allen Tageszeiten.

Danke an meine Freunde und Kommilitonen für ihre Motivation und Freundschaft.

Zum Schluss ein ganz persönlicher Dank an Daniel für seine Ermutigung und Ehrlichkeit.