

Aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Chromogranin A im Rahmen von gastrointestinalen und endokrinen
Autoimmunerkrankungen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Antonia Xenia Ebert
aus Bad Soden am Taunus

Mainz, 2019

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

30. Juni 2020

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	X
Abbildungsverzeichnis	XI
1. Einleitung	1
1.1 Ziel der Dissertation	2
2. Literaturdiskussion	3
2.1 Chromogranin A	3
2.1.1 Aufbau, Biosynthese, Funktion und Vorkommen	3
2.1.2 Nicht-onkologische Interferenzen der Chromogranin A-Messung	6
2.1.3 Messmethoden	7
2.1.4 Neuroendokriner Tumor	7
2.2 Autoimmunität	12
2.2.1 Definition	12
2.2.2 Pathophysiologie	12
2.2.3 Klassifikation	13
2.3 Autoimmunerkrankungen und Chromogranin A	14
2.3.1 Endokrine Autoimmunerkrankungen und Chromogranin A	14
2.3.2 Gastrointestinale Autoimmunerkrankungen und Chromogranin A	24
3. Material und Methoden	30
3.1 Datenerfassung	30
3.1.1 Kollektive	30
3.1.2 Laborparameter	32
3.2 Material	33
3.2.1 Analysegerät	33
3.2.2 Serumblutproben	34

3.2.3 Verbrauchsmaterial	34
3.2.4 Software	35
3.3 Methoden	36
3.3.1 Chromogranin A-Messung mithilfe des Kryptors	36
3.3.2 Messprinzip: TRACE®-Technologie	37
3.3.3 Technische Daten des BRAHMS KRYPTOR compact PLUS	39
3.4 Statistische Methoden	39
4. Ergebnisse	41
4.1 Demographische Daten	41
4.1.1 Geschlechterverteilung	43
4.1.2 Altersverteilung	44
4.2 Serologische Daten: Chromogranin A	46
4.3 Regressionsmodelle	49
4.3.1 Logistisches Regressionsmodell	49
4.3.2 Lineares Regressionsmodell	52
4.4 Gastrin, Parietalzell-Antikörper und Intrinsic Faktor-Antikörper	55
4.4.1 Korrelation der Chromogranin A- und Gastrin-Konzentrationen	55
4.5 Receiver Operating Characteristic	57
4.5.1 Vergleich der ROC-Kurven einzelner Parameter (CgA, PCA und IFA)	58
4.5.3 Vergleich der ROC-Kurven aus Kombinationen der Parameter	59
5. Diskussion	61
5.1 Autoimmunität und Chromogranin A	61
5.2 Einflussfaktoren auf den Chromogranin A-Serumspiegel	67
5.3 Diskussion der Messmethode	68
5.4 Limitationen	70
6. Zusammenfassung	72
7. Literaturverzeichnis	74

Danksagung	91
Tabellarischer Lebenslauf	92

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
AD	M. Addison (= Addison's disease)
AG	Autoimmungastritis
AK	Antikörper
AUC	<i>Area under the Curve</i> (= Fläche unter der Kurve)
AIT	Autoimmunthyreopathie
Anti-GAD-AK	Glutamatdecarboxylase-Antikörper
Anti-IA2-AK	Tyrosinphosphatase IA-2-Antikörper
Anti-ZnT8-AK	Zinktransporter 8-Antikörper
AP	Autoimmun-Polyendokrinopathie
APECED-Syndrom	Autoimmunes-Polyendokrinopathie- Candidiasis-ektodermales-Dystrophie- Syndrom
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
C	gesunde Kontrollgruppe
CD	Zöliakie (= <i>Celiac disease</i>)
CgA	Chromogranin A
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DNES	diffuses neuroendokrines System
ENETS	<i>European Neuroendocrine Tumor Society</i>
fT3	freies Trijodthyronin
fT4	freies Thyroxin
GD	M. Basedow (= <i>Graves' disease</i>)
GMR	Geometrisches Mittelwertverhältnis
ggf.	gegebenenfalls
HbA1c	Glykohämoglobin
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
H. pylori	<i>Helicobacter pylori</i>
HT	Hashimoto Thyreoiditis

IAA	Insulin-Auto-Antikörper
ICA	Zytoplasmatische Inselzell-Antikörper
IF	Intrinsic Faktor
IFA	Intrinsic Faktor-Antikörper
KI	Konfidenzintervall
l	Liter
Lg	Logarithmus zur Basis 10
M	Mittelwert
m	männlich
MCV	mittleres korpuskuläres Volumen
MEN1	multiple endokrine Neoplasie Typ 1
MGA	monoglanduläre Autoimmunität
min	Minute
ml	Mililiter
N	Anzahl
NET	Neuroendokrine(r) Tumor(e)
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NNR	Nebennierenrinde
NOD-Maus	<i>Non-obese diabetic</i> -Maus
oGTT	oraler Glucosetoleranztest
OR	Odds Ratio
ÖGD	Ösophagogastroduodenoskopie
PCA	Parietalzell-Antikörper
PTM	posttranslationale Modifikation
Rel	Angehörige von Autoimmungastritis Patienten (= <i>Relatives</i>)
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
RG	Referenzgruppe
SD	Standardabweichung
TG2	Transglutaminase 2
Th	T-Helferzellen
TN	Patienten mit Schilddrüsenknoten/ Schilddrüsenknoten (= <i>Thyroid nodule</i>)

TRACE	<i>Time Resolved Amplified Cryptate Emission</i>
TRAK	TSH-Rezeptor-Antikörper
TPO-AK	Antikörper gegen die thyreoidale Peroxidase
T1D	Typ 1 Diabetes mellitus
T2D	Typ 2 Diabetes mellitus
u.a.	unter anderem
µg	Mikrogramm
µs	Mikrosekunden
v.a.	vor allem
VK	Variationskoeffizient
vs.	versus
w	weiblich
z.B.	zum Beispiel

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Überblick der wichtigsten Chromogranin A-Derivate und deren Funktion (modifiziert nach (1)).....	5
Tabelle 2 Übersicht der adulten Autoimmun-Polyendokrinopathie (modifiziert nach (16, 17, 155))	18
Tabelle 3 Kollektivübersicht und Diagnosekriterien (Kriterien nach (253))	31
Tabelle 4 Laborparameter mit Skalenniveau und Referenzwerten	32
Tabelle 5 Testkit BRAHMS Chromogranin A (CgA) II Kryptor (258).....	34
Tabelle 6 Verbrauchsmaterial BRAHMS KRYPTOR compact PLUS (258, 259)	34
Tabelle 7 Sonstiges Verbrauchsmaterial	35
Tabelle 8 Softwareinformationen.....	35
Tabelle 9 Eigenschaften der Elemente Europium Kryptat, Alexa Fluor 647 und des Immunkomplexes (modifiziert nach (258, 260))	37
Tabelle 10 Technische Daten des BRAHMS KRYPTOR compact PLUS (262).....	39
Tabelle 11 Demographische Daten.....	42
Tabelle 12 Serologische Daten: Vergleich der Mediane und der 25./ 75. Perzentilen des dekadischen Logarithmus von Chromogranin A (ng/ml)	46
Tabelle 13 Multivariable logistische Regression der Positivität von Chromogranin A	50
Tabelle 14 Multivariable lineare Regression des dekadischen Logarithmus von Chromogranin A	53
Tabelle 15 Dekadischer Logarithmus von Gastrin und Prozentsatz der PCA-Positiven und IFA-Positiven im Autoimmungastritis-Kollektiv	55
Tabelle 16 Spearman-Korrelationskoeffizient des dekadischen Logarithmus von Chromogranin A und des dekadischen Logarithmus von Gastrin im Autoimmungastritis-Kollektiv	55
Tabelle 17 Multivariables logistisches Modell zur Diskriminierung zwischen der Autoimmungastritis und der gesunden Kontrollgruppe	60

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Intrazelluläre Chromogranin A-Synthese (modifiziert nach (5))	4
Abbildung 2 BRAHMS KRYPTOR compact PLUS (257)	33
Abbildung 3 Darstellung eines Testdurchlaufs (260).....	36
Abbildung 4 Sandwich-Assay BRAHMS Kryptor compact plus (modifiziert nach (258, 260))	38
Abbildung 5 Ablauf einer Messung (256).....	38
Abbildung 6 Säulendiagramm der Geschlechterverteilung in der Autoimmunität allgemein (N = 555), in endokriner (N = 358) und in gastrointestinaler (N =197) Autoimmunität sowie in der Referenzgruppe.....	43
Abbildung 7 Histogramm der Altersverteilung des Gesamtkollektivs	44
Abbildung 8 Histogramm der Altersverteilung der Autoimmunität allgemein (N = 555) und der Referenzgruppe (N = 131)	45
Abbildung 9 Histogramm der Altersverteilung der endokrinen (N = 358) und gastrointestinalen (N = 197) Autoimmunität	45
Abbildung 10 Säulendiagramm der binären Chromogranin A-Verteilung sortiert nach Kollektiven.....	47
Abbildung 11 Boxplot des dekadischen Logarithmus der Chromogranin A-Serumspiegel der verschiedenen Kollektive.....	48
Abbildung 12 Graphische Darstellung der paarweisen Vergleiche aller Kollektive bezüglich des binären Outcomes von Chromogranin A.....	51
Abbildung 13 Graphische Darstellung der paarweisen Vergleiche der Unterschiede aller Kollektive bezüglich des dekadischen Logarithmus von Chromogranin A	54
Abbildung 14 Korrelation der dekadischen Logarithmen der Chromogranin A- (ng/ml) und der Gastrin-Serumspiegel (pg/ml) im Autoimmungastritis-Kollektiv.....	56
Abbildung 15 Receiver Operating Characteristic-Kurven von Chromogranin A, Parietalzell- und Intrinsic Faktor-Antikörper zur Differenzierung zwischen Patienten mit Autoimmungastritis und der gesunden Kontrollgruppe.	58
Abbildung 16 Receiver Operating Characteristic-Kurven von Chromogranin A, Parietalzell- und Intrinsic Faktor-Antikörper und deren Kombinationen zur Differenzierung zwischen Patienten mit Autoimmungastritis und der gesunden Kontrollgruppe.	59

1. Einleitung

Chromogranin A (CgA) ist ein saures, hydrophiles Glykopeptid, das von endokrinen und neuroendokrinen Zellen des Körpers exprimiert und sezerniert wird (1, 2). Es wurde 1965 erstmals im Nebennierenmark entdeckt und kommt in diversen humanen Gewebsarten vor (2, 3). Die genaue physiologische Funktion von CgA und seiner Derivate ist bis heute nicht vollständig verstanden. Neben der Erforschung der zahlreichen biologischen Aufgaben, widmet sich die Wissenschaft der Bedeutung des Peptids für Erkrankungen und untersucht hierbei seine pathophysiologische Rolle sowie seinen Nutzen als immunhistochemischen und serologischen Marker (2, 4).

Klinisch dient CgA aktuell als wichtigster Tumormarker neuroendokriner Tumore (NET) und wird dort im Rahmen der Diagnostik, Prognostik, Verlaufskontrolle und Nachsorge vielfältig eingesetzt (5, 6).

Studien zeigen zudem erhöhte CgA-Blutkonzentrationen in benignen Erkrankungen (7). Auch zeugt CgA in inflammatorischen Prozessen von Relevanz, indem Immunzellen unter Stress selbst CgA sezernieren und das Peptid an der Immunmodulation beteiligt ist (7-11). Gleichwohl mangelt es an Kenntnissen über das Vorkommen und die Bedeutung von Serum-CgA in Autoimmunerkrankungen.

Ungefähr 5% (Prozent) der Population leiden an einer Autoimmunkrankheit, die infolge einer fehlerhaften Immuntoleranz gegenüber körpereigenen Antigenen entsteht (12, 13). Gemäß der betroffenen Gewebe können diese Erkrankungen in endokrine und gastrointestinale Autoimmunitäten eingeteilt werden, die gehäuft zusammen auftreten und eine das Immunsystem-betreffende genetische Verbindung aufweisen (14). So ist das gehäufte Auftreten von Zöliakie (CD) mit Schilddrüsen- oder Typ 1 Diabetes mellitus (T1D)-Antikörpern (AK) und/ oder die multiple glanduläre Autoimmunität (T1D, M. Basedow (GD), Hashimoto Thyreoiditis (HT)) durch die genetische Assoziation mit *Human Leukocyte Antigen* (HLA)-DQ2 und/ oder -DQ8 determiniert (14, 15).

Viele Autoimmunerkrankungen sind zunächst subklinisch und werden erst nach Jahren symptomatisch (16, 17). Trotz bereits etablierter serologischer Marker wie Auto-AK gehen Autoimmunkrankheiten oftmals mit einer verzögerten Diagnosestellung einher (18-20). Dies verhindert ein frühzeitiges therapeutisches Eingreifen, was schwerwiegende Folgen haben kann. Fraglich ist, inwieweit CgA als serologischer Parameter von Autoimmunkrankheiten dienen kann. Sein Potential als stabiler Biomarker hat es bereits in NET unter Beweis gestellt (21).

1.1 Ziel der Dissertation

Ziel der vorliegenden Dissertation ist das Vorkommen und die Bedeutung von Serum-CgA in endokriner und gastrointestinaler Autoimmunität zu erörtern. Mithilfe dieser retrospektiven Querschnittsstudie sollen zudem diverse Einflussfaktoren auf CgA ermittelt und der mögliche Einsatz von CgA als serologischer Marker für Autoimmunerkrankungen beispielhaft anhand des Autoimmungastritis (AG)-Kollektivs evaluiert werden.

2. Literaturdiskussion

Der folgende Abschnitt zeigt den aktuellen Stand der Forschung zum Thema CgA und Autoimmunität auf und setzt sich mit der vorliegenden Literatur zu wichtigen Themengebieten dieser Studie auseinander.

2.1 Chromogranin A

2.1.1 Aufbau, Biosynthese, Funktion und Vorkommen

CgA, auch bekannt als Sekretorisches Protein I, ist ein hydrophil saures, einkettiges Peptid der Granin-Familie, welches sich aus insgesamt 439 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von ungefähr 49kDA zusammensetzt (1, 3, 22). Als erstes seiner Familie wird CgA vor mehr als 50 Jahren in der Literatur erwähnt und von *Blaschko et al. (1967)* als Marker für die Sekretion neuroendokriner Zellen beschrieben (1, 2, 6, 21, 23, 24). Die strukturelle Ähnlichkeit der acht Peptide der Granin-Familie ist gering, dennoch haben sie einige Gemeinsamkeiten (2, 6). Sie sind thermostabil, besitzen einen hohen Anteil an sauren Aminosäuren und verfügen über eine hohe Bindungskapazität, wenngleich milde Affinität für Calcium (2). Dies bewirkt eine Aggregation sowohl bei saurem pH als auch in Anwesenheit von Calcium (1, 2, 25, 26).

Das für CgA codierende *single-copy* Gen befindet sich auf dem langen Arm von Chromosom 14 (14q32) (2, 27). Aufgrund seines Vorkommens in diversen Gewebsarten ist seine Biosynthese durch eine hohe Anpassungsfähigkeit an Modulationssignale gekennzeichnet (2, 28). Im Anschluss an die zellspezifische Expression von CgA, welche unter anderem (u.a.) durch Steroidhormone reguliert und durch Nikotin beeinflusst wird, erfolgt die Akkumulation im Trans-Golgi-Netzwerk und die vesikuläre Verpackung des Peptides (2, 6, 21, 29-31). Gemeinsam mit Hormonen und Neurotransmittern wie Katecholaminen wird CgA schließlich auf zwei Wegen per Exozytose aus den Zellen abgegeben: 1.) kontinuierlich ohne vorherige Speicherung, 2.) regulatorisch nach vorangegangener Speicherung infolge eines externen Signals (1, 2, 32, 33).

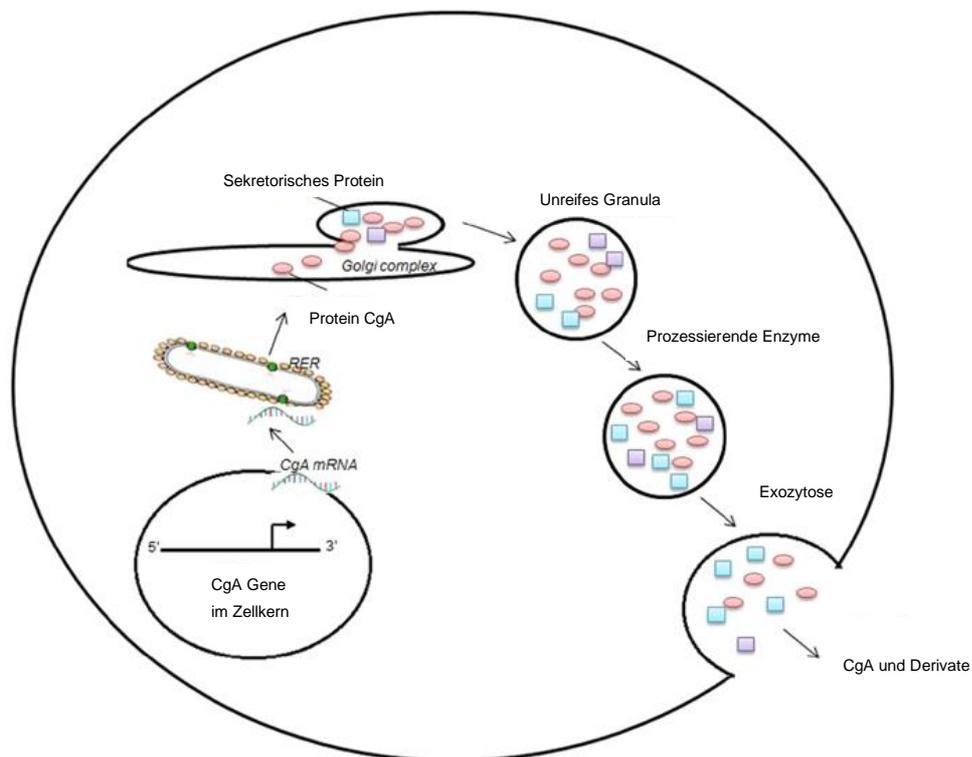


Abbildung 1 Intrazelluläre Chromogranin A-Synthese (modifiziert nach (5))

CgA dient als Vorläufer diverser biologisch aktiver Derivate, welche sowohl mittels einer intrazellulären, häufig intravesikulären, als auch extrazellulären Prozessierung erzeugt werden (34-36). Innerhalb des CgA-Peptids dienen Stellen mit dibasischen Aminosäuren als Angriffspunkte für proteolytische Enzyme. Weitere Abwandlungen geschehen im Rahmen von posttranslationalen Modifikationen (PTM) (1, 2, 37). Der Umbau ist gewebsspezifisch und somit abhängig vom jeweiligen Zelltyp und der dort vorhandenen Menge an Proteasen (3, 38-40).

Die genaue Funktion der Chromogranine ist trotz zahlreicher Untersuchungen nicht eindeutig geklärt (2, 6). Es ist hingegen eine Beteiligung an diversen intra- und extrazellulären biologischen Prozessen beschrieben (2).

Die Rolle als Prohormon ist vermutlich eines der wichtigsten Merkmale von CgA. Tabelle 1 gibt einen Überblick der bekanntesten Derivate von CgA und deren endokrinen, autokrinen sowie parakrinen Funktionen (1, 2, 41, 42).

Tabelle 1 Überblick der wichtigsten Chromogranin A-Derivate und deren Funktion (modifiziert nach (1))

Chromogranin A-Derivate	Biologische Funktion
Vasostatin I	<ul style="list-style-type: none"> • Hemmung der Vasokonstriktion • Hemmung der Parathormon-Sekretion • Förderung der Fibroblastenadhäsion • Einfluss auf die Tumorangiogenese (4) • Modulation der glatten Muskulatur der Koronarien (43) • Bakteriolytische und antifugale Wirkung
Vasostatin II	<ul style="list-style-type: none"> • Hemmung der Vasokonstriktion • Hemmung der Sekretion von Nebenschilddrüsenhormonen
Pancreastatin (44-46)	<ul style="list-style-type: none"> • Steigerung des Blutzuckerspiegels <ul style="list-style-type: none"> ○ Hemmung der Glucose-induzierten Insulinfreisetzung ○ Förderung der hepatischen Glykogenolyse ○ Minderung der Insulin-induzierten Glykogensynthese ○ Minderung der Glucoseaufnahme der Skelettmuskulatur (47) • Stimulierung der Amylase-Sekretion des Pankreas • Minderung der Magensäuresekretion der Parietalzellen
Catestatin	<ul style="list-style-type: none"> • Hemmung der Katecholamin-Freisetzung des Nebennierenmarks
Parastatin	<ul style="list-style-type: none"> • Hemmung der Parathormon-Sekretion (48)
Prochromacin; Chromacin I & II	<ul style="list-style-type: none"> • Bakteriolytische und antifugale Wirkung (49, 50)
WE-14	<ul style="list-style-type: none"> • Förderung der Histamin-Freisetzung aus Mastzellen (3)

Intrazellulär bildet CgA die Hauptkomponente der kerndichten sekretorischen Granula. CgA unterstützt in den Zellen die Granulogenese und ist an der Lagerung, Sortierung und Freisetzung von Hormonen und Neurotransmittern beteiligt (1, 2, 33, 51-53). Die oben genannten Aufgaben erfüllt es u.a. über eine Reduktion des osmotischen Drucks und über die Bindung von Calcium und Katecholaminen (1, 2, 21).

Physiologisch wird CgA von endokrinen und neuroendokrinen Zellen des menschlichen Körpers produziert und ist reichlich vorhanden. Die Synthese erfolgt vorwiegend im Nebennierenmark, wo es als erstes entdeckt wurde (1, 23, 54). Auch synaptische Vesikel des sympathischen, zentralen und peripheren Nervensystems sowie das diffuse neuroendokrine System (DNES) exprimieren CgA (2). *Dimsdale (1992)* stellt sogar eine Korrelation von CgA mit dem Sympathikustonus fest, welche auf der gemeinsamen Lagerung und Freisetzung aus Vesikeln beruht (55).

Die Konzentration von CgA nimmt vom Nebennierenmark über die Hypophyse > Pankreas > Gastrointestinaltrakt (Magen, Jejunum, Ileum) > Frontalkortex > Nebenschilddrüse und die Schilddrüse ab (2).

2.1.2 Nicht-onkologische Interferenzen der Chromogranin A-Messung

Neben der Bedeutung von NET für CgA, sind in der Literatur bereits zahlreiche nicht-onkologische Erkrankungen mit erhöhten CgA-Serum-/Plasmaspiegel beschrieben. Ein Anstieg der CgA-Spiegel kann bei Patienten mit Organversagen beobachtet werden (1, 2). Am deutlichsten sichtbar wird dies im Rahmen eines Nierenversagens infolge der verminderten Ausscheidung der CgA-Fragmente. Der Anstieg der CgA-Werte korreliert mit der Schwere der Niereninsuffizienz (3, 56). Im Endstadium des Nierenversagens können die CgA-Werte sogar jenen von Patienten mit NET entsprechen (1, 57, 58). CgA wird zusätzlich zur renalen Eliminierung auch hepatisch metabolisiert (3). *Taupenot et al. (2003)* erläutert die moderate Erhöhung bei Leberversagen zum einen durch eine insuffiziente Metabolisierung des Peptids und zum anderen durch eine mögliche vermehrte Aktivierung des neuroendokrinen Systems (1). Die Schwere der Herzinsuffizienz korreliert ebenfalls mit der Höhe an CgA, das als möglicher Parameter der Mortalitätsvorhersage dienen könnte (1, 59). Zudem wurde bereits 1990 entdeckt, dass Patienten mit unbehandelter Hypertonie erhöhte CgA-Spiegel aufweisen (60). Auch eine starke Sympathikusaktivierung infolge von Stress und körperlicher Betätigung kann die CgA-Werte bis auf das Zweifache des oberen Grenzwertes erhöhen (2, 61). Ein Anstieg von CgA kann auch bei einigen gastroenterologischen Erkrankungen wie beispielsweise (bspw.) den chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und der Autoimmungastritis beobachtet werden (2, 6, 62-64).

Der CgA-Spiegel steigt ebenso durch die Einnahme von Medikamenten wie bspw. Protonenpumpeninhibitoren und H₂-Rezeptorantagonisten oder einer Steroidbehandlung (2, 6, 65-68). Zur Vermeidung eines Nahrungseinflusses auf die CgA-Werte wird eine Nüchtern-Blutentnahme als standardisiertes Vorgehen empfohlen (6).

Demographische Faktoren wie das Alter haben ebenfalls einen Einfluss auf CgA, wohingegen das Geschlecht keine Rolle zu spielen scheint (66, 69). Eine andere Studie belegt eine vermehrte CgA-Produktion durch Nikotin (8). Dies beschreibt nur einen Teil der diversen Einflussfaktoren auf CgA. Die zwei wesentlichsten

Interferenzen sind die Niereninsuffizienz und die Hypergastrinämie (3). Im Verlauf dieser Arbeit werden weitere Erkrankungen und Faktoren genauer analysiert.

2.1.3 Messmethoden

Die Bestimmung des serologischen CgA wird erstmals 1984 von O'Connor und Bernstein beschrieben (3, 70).

Heutzutage stehen zahlreiche Analysen zur Messung des im Plasma beziehungsweise (bzw.) Serum zirkulierenden intakten CgA sowie seiner Fragmente zur Verfügung (1, 6). Die Methoden basieren auf einem Radioimmunassay, einem Enzymimmunassay (ELISA) oder auf einem Immunassay mit der *Time Resolved Amplified Cryptate Emission* (TRACE)-Technologie (1, 38, 71, 72).

Die Charakteristiken diverser Kits (CisBio, DAKO, EuroDiagnostica, Kryptor) sind in der Literatur bereits genauer evaluiert worden (38, 71, 72). *Syversen et al. (1994)* erkennt gut korrelierende Ergebnisse des Enzym- und Radioimmunassays. In seiner Studie weisen Enzymimmunassays ein niedrigeres Detektionslimit und Radioimmunassays eine weitere Messspanne auf (6, 73). Eine stark positiv lineare und signifikante Korrelation ($r = 0,9858$; $p < 0,0001$) zwischen Serum- und Plasma-CgA-Spiegeln zeigt, dass beide Blutbestandteile zur Bestimmung der CgA-Konzentration geeignet sind und im Verhältnis übereinstimmen (6, 74).

2.1.4 Neuroendokriner Tumor

Im Folgenden wird die Erkrankung der NET und die Bedeutung von CgA als Tumormarker in jenem Kollektiv genauer erläutert. Dies gibt einen Einblick in die Fähigkeiten von CgA als Biomarker und beschreibt zugleich die Positivkontrolle in dieser Arbeit.

2.1.4.1 Übersicht NET

NET sind eine seltene, heterogene Gruppe von Tumoren, welche sich aus Stammzellen des DNES ableiten und die Fähigkeit zur Synthese und Sekretion biologisch aktiver Moleküle besitzen (6, 71, 75-77). Die embryologische Abstammung kann sowohl neuroektodermal als auch endodermal sein (76). Die Tumore sind überwiegend im Verdauungs- und Respirationstrakt lokalisiert. Weitere bekannte NET-Arten sind das Phäochromozytom, das Neuroblastom, das Hypophysenadenom sowie das medulläre Schilddrüsenkarzinom (75, 76). Bei bis zu 12,6% der Tumore bleibt der Primarius unklar (75). Die Heterogenität zeigt sich auch im Malignitätspotential und dem Differenzierungsgrad, bei dem die gesamte Bandbreite möglich ist (75, 78).

Epidemiologie

Die Zahl der Neuerkrankungen in Europa liegt aktuell bei 3 pro 100 000 Einwohnern pro Jahr mit weltweit steigender Inzidenzrate (79). Eine Diagnosestellung ist in jedem Alter möglich, tritt jedoch meist in höherem Alter auf (Median Deutschland: 59 Jahre) (75). Obgleich das Auftreten meist sporadisch ist, kann dennoch eine genetische Assoziation mit bspw. der multiplen endokrinen Neoplasie Typ 1 (MEN1) bestehen (75, 80).

Klinik

Die Klinik der NET wird entscheidend vom jeweiligen Sekretionsmuster beeinflusst (77). Erzeugt der Tumor durch seine Sekretion von Hormonen/Neurotransmittern ein charakteristisches endokrines Syndrom, so spricht man von einem funktionellen NET (76). Diese machen weniger als 10% aller NET aus (71), sind jedoch in Tumoren des Vorderdarms mit 50% vertreten (77). Ein typisches Beispiel ist das Karzinoïdsyndrom, das durch die vermehrte Freisetzung von Serotonin auftritt und mit der Trias Diarrhö, Flush und kardialen Symptomen einhergeht. Weitere mögliche Symptome eines funktionellen NET sind Hypo-/Hyperglykämien, Bronchospasmen sowie Symptome aufgrund der Größenzunahme des Tumors (2, 75, 77). Der Großteil der NET sind nicht-funktionelle Tumore. Sie sind oft asymptomatisch und werden erst durch Komplikationen der Raumforderungen, wie bspw. Stenosesymptome, auffällig. Dies sorgt dafür, dass der Tumor häufig als Zufallsbefund diagnostiziert wird (5, 75).

Diagnostik

Die Diagnosestellung eines NET erfolgt in 60-80% der Fälle im bereits metastasierten Stadium. Dies wird auf die Seltenheit und Heterogenität des Krankheitsbildes sowie auf den mangelnden Bekanntheitsgrad der Erkrankung zurückgeführt (6, 75). Der stille Krankheitsverlauf nicht-funktioneller NET sorgt dafür, dass diese meist noch später als funktionelle diagnostiziert werden (81).

Das diagnostische Vorgehen beruht allgemein auf drei Methoden: der serologischen, bildgebenden und histopathologischen Diagnostik. Zunächst werden generelle Tumormarker, u.a. CgA, auf dessen Bedeutung später genauer eingegangen wird, serologisch bestimmt. Abhängig von der Symptomatik werden zusätzlich spezielle hormonelle Assays durchgeführt. Mithilfe bildgebender Verfahren (Sonographie, Kontrastmittel-CT/-MRT, PET-CT) wird versucht die Lokalisation und Ausbreitung des Tumors zu identifizieren. Als Goldstandard der Diagnosesicherung gilt der

immunohistochemische Nachweis der neuroendokrinen Biomarker CgA, Synaptophysin und NSE im Biopsat des Tumors oder seiner Metastasen (3, 75).

Therapie und Nachsorge

Die Wahl der Therapie ist abhängig von der Lokalisation, dem Ausmaß und der Differenzierung des Tumors (3). Die chirurgische oder endoskopische R0-Resektion stellt die einzige kurative Option dar. Das Ziel der Therapie im metastasierten Stadium ist die Symptomkontrolle sowie die Antiproliferation. Hierbei kommen sowohl pharmakologische als auch lokal-ablative Verfahren zum Einsatz (75, 77).

Die *European Neuroendocrine Tumor Society* (ENETS) empfiehlt die regelmäßige Nachsorge sowie Verlaufskontrolle. Ziel der Kontrollen ist die frühzeitige Erkennung von Rezidiven nach chirurgischer Resektion oder die engmaschige Überwachung des Krankheitsverlaufs bei fortgeschrittenen Stadien (6). Die Durchführung der Labordiagnostik, Bildgebung und Betreuung soll in spezialisierten Zentren erfolgen (67, 75, 82).

2.1.4.2 NET und Chromogranin A

CgA gilt seit über 30 Jahren als wichtiger Tumormarker des NET und wird hierfür sowohl serologisch als auch immunohistochemisch verwendet (2, 5, 6, 38, 70, 72). Sein klinischer Einsatz ist in der Literatur Gegenstand vielfältiger Untersuchungen und Diskussionen (5). Der folgende Abschnitt verleiht einen Überblick über die Bedeutung von CgA bei NET und die diversen, in der Literatur vertretenen Ansichten diesbezüglich.

Immunohistochemischer Marker

CgA gilt als effektiver immunohistochemischer Marker der NET. Seine Positivität bestätigt die neuroendokrine Herkunft des Biopsats und erlaubt somit eine Zuteilung zu den NET (1, 3, 21, 67). Die Intensität der Immunfärbung muss hierbei nicht mit der sekretorischen Aktivität der Tumorzellen übereinstimmen (76). Dies ist von Vorteil bei der Detektion nicht-funktioneller NET, da der Nachweis von CgA in den dichten Vesikeln der Tumorzellen trotz möglicher Verminderung der Sekretion erhalten bleibt (31, 83). Die Sensitivität des Biomarkers ist jedoch limitiert. Sie nimmt zum einen mit sinkendem Differenzierungsgrad des NET ab, zum anderen exprimieren bestimmte Tumore CgA nur schwach und liegen somit unter der Detektionsgrenze (wie zum Beispiel (z.B.) das kleinzellige Lungenkarzinom) (31, 76).

Serologischer Marker

Auch serologisch hat sich CgA als der geeignetste generelle Biomarker für NET erwiesen und seine diagnostische Überlegenheit gegenüber NSE in diversen Studien belegt (3, 6, 84, 85). Pathophysiologisch erklärt sich die CgA-Spiegelerhöhung durch die gemeinsame Lagerung und Sekretion von CgA mit Peptidhormonen aus den Tumorzellen (2, 86). Multiple Studien zeigen den Einfluss 1.) der Tumorzellart, 2.) des Tumolvolumens sowie 3.) seiner histologischen Differenzierung auf die Höhe des CgA-Blutspiegels bei NET (2, 3, 67, 84).

1.) Die Lokalisation der NET muss bei der Interpretation der CgA-Werte laut *Herbomez et al. (2010)* stets berücksichtigt werden (3). Das Phäochromozytom sowie das Neuroblastom stehen für NET mit hoher CgA-Sekretion. Dies erklärt die hervorragenden diagnostischen Ergebnisse mittels CgA-Bestimmung (3, 87-91). Mittel- sowie Enddarmtumore neuroendokriner Herkunft und nicht-funktionelle Pankreastumore vertreten die NET mit intermediärem CgA-Sekretionspotential (3). CgA wird nur in geringen Mengen vom medullären Schilddrüsenkarzinom, Insulinom, kleinzelligen Lungenkarzinom und dem Hypophysenadenom sezerniert. Für letzteres erweisen sich andere diagnostische Assays als effizienter (3, 84, 92).

2.) Die beschriebene, signifikant lineare Beziehung zwischen der Tumormasse und der Höhe der CgA-Niveaus ist laut Literatur für alle NET außer dem Gastrinom zulässig. Grund hierfür ist, dass die stark erhöhten CgA-Werte bei Gastrinomen nicht allein auf die Raumforderung, sondern auch auf die durch Hypergastrinämie bedingte ECL-Zellhyperplasie zurückzuführen ist (3, 31, 62, 67, 85).

3.) Gut differenzierte NET-Zellen exprimieren im Vergleich zu gering differenzierten Zellen mehr CgA (6, 93).

Die klinische Verwendung von CgA im Rahmen der NET ist vielfältig (76). Durch die hohe Stabilität des Markers profiliert sich CgA gegenüber bereits bestehenden instabilen Markern mit hoher Fluktuation (31).

Chromogranin A in der NET-Diagnostik

Der alleinige Einsatz von serologischem CgA als Screening-Methode für die Gesamtheit der NET wird nicht empfohlen (77).

Die Angaben der Literatur bezüglich der Sensitivität und Spezifität des zirkulierenden CgA für NET variieren stark. Über alle NET gesehen liegt die Spezifität bei 68-100% und die Sensitivität bei 60-90% (ausgenommen medulläre Schilddrüsenkarzinome) (76). Multiple Einflussfaktoren erläutern die Bandbreite der Spezifität. Sie ist sowohl abhängig von der Tumorart und -last, als auch von den in Studien verwendeten

Grenzwerten und der Qualität der Kontrollgruppe (67). Die in Abschnitt 2.1.2 beschriebenen Interferenzen beeinträchtigen die Spezifität enorm. So bewirkt der Ausschluss dieser Faktoren eine Spezifität von $\geq 95\%$ (5).

Die Tumordifferenzierung, das NET-Stadium (lokalisiert/metastasiert) sowie die funktionelle Aktivität (funktionell/nicht-funktionell) beeinflussen die Sensitivität und erklären somit die Variabilität der Studienergebnisse (3, 76, 84, 85, 94). So weist zirkulierendes CgA eine niedrigere Sensitivität für nicht-funktionelle und lokalisierte NET auf (84). CgA erreicht die höchste Sensitivität in NET des Vorderdarms, weshalb *Baudin et al. (2001)* hierfür ein CgA-Routinescreening empfiehlt. In Phäochromozytomen und NET des Ileums können vergleichbare Sensitivitäten wie bei bisher verwendeten Tumormarkern erzielt werden (76, 84).

Marotta et al. (2018) ist der Ansicht, dass die Bestimmung von CgA nur im Rahmen von funktionellen und fortgeschrittenen NET Beachtung finden sollte (5). Andere Autoren hingegen sind der Meinung, dass CgA gerade bei klinisch stillen NET, die Hormon-negativ aber CgA-positiv sind, nützlich sein kann (1, 31, 85, 95).

Chromogranin A als Prognosefaktor

CgA wird als unabhängiger Vorhersagefaktor für das Outcome bei Patienten mit NET gehandelt. So bedeuten hohe CgA-Spiegel bei Patienten mit fortgeschrittenen NET eine schlechtere Überlebensprognose (2, 5, 96). Dies beruht überwiegend auf der zuvor gezeigten Beziehung zwischen Tumormarkern und CgA. Studien zeigen zudem höhere Tumormarker bei Patienten mit ausgedehnten Metastasen im Vergleich zu lokalisierten NET, wobei auch hier das Gastrinom eine Ausnahme darstellt (69, 97, 98). *Marotta et al. (2018)* verdeutlicht, eine unzureichende Datenlage über die Rolle von CgA als Prognosefaktor bei lokalisierten NET (5).

Chromogranin A als Verlaufsparemeter

CgA kann evidenzbasiert als Verlaufsparemeter während der medikamentösen Behandlung eines NET verwendet werden (99). Effektive Behandlungen des Tumors gehen laut vielfältiger, zum Teil Placebo-kontrollierter Studien mit einem Abfall des CgA-Spiegels einher (1, 2, 5, 6, 100). Mithilfe des Markers ist somit eine Beurteilung des Therapieansprechens und eine gegebenenfalls (ggf.) notwendige Reevaluation der eingesetzten Medikamente möglich (5, 101).

Chromogranin A als Nachsorgeparemeter

Die Bestimmung von CgA ist laut Konsensus Bestandteil der regelmäßigen Nachsorge bei Patienten nach radikaler Resektion (102). Ein CgA-Anstieg über die Normwerte gilt

als erster Hinweis eines Rezidivs (103). Die Evidenz ist allerdings aufgrund der geringen Studien- und Probandenzahl gering (5).

2.2 Autoimmunität

2.2.1 Definition

Autoimmunität bezeichnet die Unfähigkeit des Immunsystems zwischen körpereigenem Gewebe und körperfremden, möglicherweise schädlichen Antigenen zu unterscheiden. Es beschreibt somit den Ausfall der Immuntoleranz gegenüber spezifischen endogenen Antigenen (12).

Dank diverser Mechanismen der Selbsttoleranz ist das Vorkommen von Autoimmunerkrankungen, die den aus der Autoaggression resultierenden chronisch entzündlichen Prozess umfassen, selten (13, 104). Ungefähr 5% der Bevölkerung weltweit leidet unter einer Autoimmunerkrankung (12, 13).

2.2.2 Pathophysiologie

Zur Entstehung einer Autoimmunerkrankung bedarf es gewöhnlich der Zusammenkunft zahlreicher Ereignisse. Autoimmunerkrankungen werden selten monogenetisch vererbt, meist wird eine genetische Prädisposition polygenetisch an Nachkommen weitergegeben. Ein Zusammenhang zwischen bestimmten HLA-Allelen und bestimmten Autoimmunerkrankungen ist identifiziert (bspw. HLA-DR5 und HT). Sexualhormone sind ebenfalls an der Entwicklung der Immunantwort beteiligt. Östrogene bewirken eine Erhöhung autoreaktiver B-Lymphozyten und den von ihnen produzierten Auto-AK. Auch die geschlechtsspezifische Häufung von Autoimmunerkrankungen suggeriert diesen Einfluss. 65% der Menschen, welche unter einer Autoimmunerkrankung leiden, sind Frauen im gebärfähigen Alter (13).

Äußere Umwelteinflüsse wie Infektionen, Medikamente, Drogen und UV-Strahlung sind häufig Auslöser der Erkrankungen, sofern die oben beschriebene genetische Anfälligkeit gegeben ist. Die genaue Pathogenese ist somit vielfältig und weiterhin Gegenstand aktueller Untersuchungen. Pathophysiologisch liegen den Autoimmunerkrankungen die Mechanismen der Hypersensitivitätsreaktionen der Typen II-IV zugrunde. Das Autoantigen und seine Lokalisation sowie die vorwiegend beteiligte Immunkomponente des spezifischen Immunsystems entscheiden über den dominierenden Typ. So handelt es sich bei GD und HT überwiegend um eine Typ II-Reaktion, bei T1D hingegen überwiegend um eine Typ-IV Reaktion (13).

Die Autoaggression verläuft häufig irreversibel und geht meist mit einem fortschreitenden Funktionsverlust einher, kann aber auch wie bei GD mit einer veränderten Organfunktion einhergehen (105).

2.2.3 Klassifikation

Es finden sich multiple Einteilungsmöglichkeiten für Autoimmunerkrankungen. Zunächst unterscheidet man organspezifische von systemischen Autoimmunerkrankungen (13).

In dieser Arbeit werden organspezifische Autoimmunkrankheiten betrachtet. Hierbei wenden sich Auto-AK und autoreaktive T-Zellen gegen Autoantigene, welche nur in einem oder wenigen Organen ausgeprägt sind. Ein gehäuftes Auftreten von Autoimmunerkrankungen eines Spektrums (bspw. organspezifisch) in einem Patienten wird beobachtet (13).

2.2.3.1 Endokrine und gastrointestinale Autoimmunität

In Abhängigkeit des betroffenen Organsystems lassen sich Autoimmunerkrankungen weiter klassifizieren. Die endokrine Autoimmunität umfasst z.B. T1D, HT, GD, M. Addison (AD), Hypogonadismus, Hypoparathyreoidismus und die Autoimmun-Polyendokrinopathie (AP), welche zu den registrierten, besonders seltenen Erkrankungen zählt (16, 17). AG und CD sind in der Literatur gut beschriebene gastrointestinale Autoimmunerkrankungen(106-108).

Endokrine und gastrointestinale Autoimmunitäten treten gehäuft gemeinsam auf und weisen oft krankheitsspezifische, aber auch allgemeine, das Immunsystem betreffende genetische Verbindungen auf. So beruht das gehäufte Auftreten von CD und Schilddrüsen- bzw. T1D-AK und/oder multipler glandulärer Autoimmunität (T1D, GD,HT) bspw. auf einer dominanten genetischen Assoziation der HLA DQ2 und/oder DQ8 (14, 109).

2.2.3.2 Monoglanduläre und polyglanduläre Autoimmunität

Endokrine Autoimmunitäten können wiederum in mono- und polyglandulär unterteilt werden. Die monoglanduläre Autoimmunität (MGA) beschreibt eine sich auf ein einziges endokrines Organ beschränkende Autoimmunerkrankung. Tritt jene Erkrankung isoliert auf spricht man von MGA I, sind gleichzeitig auch nicht-endokrine Autoimmunerkrankungen ausgeprägt von MGA II (16).

Das Vorhandensein von mindestens zwei endokrinen Autoimmunkrankheiten definiert die AP, auch bekannt als polyglanduläres Autoimmunsyndrom (16).

2.3 Autoimmunerkrankungen und Chromogranin A

Im Folgenden werden die wichtigsten Krankheitsaspekte der Kollektive beschrieben und der aktuelle Stand der Forschung bzgl. CgA und den Erkrankungen aufgezeigt.

2.3.1 Endokrine Autoimmunerkrankungen und Chromogranin A

2.3.1.1 Typ 1 Diabetes mellitus

T1D beschreibt einen Insulinmangel, welcher infolge einer autoimmun-induzierten T-Zell-vermittelten Zerstörung der pankreatischen Beta-Zellen entsteht und in einer chronischen Hyperglykämie mündet (105, 110-112).

Die Prävalenz und Inzidenz dieser Erkrankung unterliegen weltweit starken Schwankungen und erleben aktuell einen Zuwachs (112-115). So steigt die Inzidenz in Deutschland um 2,6% jährlich, vor allem (v.a.) bei Kindern unter 5 Jahren (113, 116).

Die Ursache dieses Anstieges wird veränderten Umweltfaktoren und Verhaltensweisen zugeschrieben (112, 113, 117). Die Erstmanifestation des T1D ist in jedem Alter möglich (112). Während einige Studien von einem Inzidenzgipfel zwischen dem 10. und 14. Lebensjahr berichten (112, 118, 119), beschreiben andere zwei Gipfel zwischen dem 5.-7. Lebensjahr und in der Pubertät (113). Aktuelle Erkenntnisse zeigen, dass bis zu 50% der T1D Erstmanifestationen im Erwachsenenalter liegen (112, 120). Jene werden jedoch aufgrund ihres Alters und fehlender typischer Symptome häufig zunächst fälschlicherweise als Typ 2 Diabetes mellitus (T2D) diagnostiziert (113, 121). Im Gegensatz zu anderen Autoimmunerkrankungen ist das männliche Geschlecht bei T1D geringfügig häufiger betroffen als das weibliche (122, 123). Die genaue Pathogenese des T1D ist trotz jahrzehntelanger Untersuchungen aufgrund ihrer Heterogenität und Komplexität weiter unklar (112, 113). Grundlegend handelt es sich hierbei um ein vielschichtiges Zusammenwirken der genetischen Prädispositionen, der Umweltfaktoren, des Immunsystems sowie des Stoffwechsels (112). T1D wird polygenetisch vererbt. Vor allem in der weißen Bevölkerung spielen die Klasse-II-HLA-Typen HLA-DR3 und/oder -DR4 eine wichtige Rolle für die Anfälligkeit gegenüber der Erkrankung. Es sind zudem über 60 weitere Genloki identifiziert, welche mit einem erhöhten Risiko an T1D zu erkranken, in Verbindung stehen (112, 124). Virusinfektionen, Ernährungsgewohnheiten und das Mikrobiom werden als Umweltfaktoren und Auslöser der Autoimmunität diskutiert (112, 113, 125, 126). Weitere mögliche Trigger sowie aufrechterhaltende Krankheitsfaktoren werden in der Überexpression der Klasse-I-HLA-Moleküle der pankreatischen Beta-Zellen (127), in der stressbedingten

fehlerhaften Synthese und PTM von Peptiden in jenen Zellen (128) und in einer veränderten vaskulären, nervalen und extrazellulären Versorgung der Langerhans-Inselzellen gesehen (112, 129-132). Auch pathologische Prozesse in Organsystemen außerhalb der Bauchspeicheldrüse wie dem Thymus, dem Knochenmark und dem Immunsystem werden beobachtet (113). Histologisch ist eine Insulitis mit Infiltration von T-Lymphozyten sichtbar (112, 133). Seit 1984 benutzt man ein vereinfachtes pathophysiologisches Modell, das davon ausgeht, dass bei vorhandener genetischer Prädisposition und passendem Trigger eine v.a. von CD4+ T-Zellen vermittelte Autoaggression des angeborenen und erworbenen Immunsystems zu einer kontinuierlichen, selektiven Zerstörung der Beta-Zellen der Langerhans-Inseln führt (112, 128). Dies hat einen Insulinmangel zur Folge, welcher ab einer Destruktion von mindestens 90% symptomatisch wird (113).

Im Vergleich zum T2D manifestiert sich der T1D meist rasch, im Extremfall in Form des lebensgefährlichen Coma diabeticum (77, 134). Patienten, v.a. im Kindesalter, klagen häufig über klassische Symptome wie Polyurie, Polydipsie, Leistungsminderung und Gewichtsverlust (77, 112, 113). Auch Sehstörungen und Krämpfe aufgrund von Elektrolytveränderungen und Pruritus lassen an ein T1D denken (77). Die typische Klinik findet sich bei Erwachsenen seltener (112, 113). Folgeschäden der Hyperglykämie in Form von Mikro- und Makroangiopathien und das erhöhte Risiko an weiteren Autoimmunitäten zu erkranken, betreffen jedoch alle Patienten (112).

Zur symptomatischen Behandlung und zur Eindämmung der Komplikationsrate ist eine lebenslange Insulintherapie mit der bestmöglichen Simulation der physiologischen Insulinfreisetzung von enormer Bedeutung (112, 113, 135). Die Einstellung erfolgt anhand des HbA1c-Wertes. Mittlerweile sind diverse Insulinarten (lang-/kurzwirksam), Applikations- (Pen/Pumpe) und Therapieformen (konventionell/intensiviert) entwickelt. Auch die Überwachung der Blutzuckerspiegel ist dank der kontinuierlichen Glucosemessung verbessert (77, 112, 113). Eine heilende Therapie ist trotz vieler Ansätze (u.a. Inselzelltransplantationen, Stammzelltherapie) bisher nicht entdeckt worden (112, 136-138).

Die Diagnostik des T1D beruht aktuell auf der Beurteilung der Klinik, der Serologie (Blutzuckerwerte und AK), des Urins (Glukosurie, Mikroalbuminurie) und der Risikofaktoren (112). Serologisch gilt ein Diabetes mellitus bei Nüchternblutzuckerwerten ≥ 126 mg/dl oder Gelegenheitsblutzuckerspiegeln ≥ 200 mg/dl, sofern Symptome vorhanden sind, oder nach einem oralen Glucosetoleranztest (oGTT) mit Glucose-

Werten nach 2 Stunden von $\geq 200\text{mg/dl}$ oder einem Glykohämoglobin (HbA1c) -Wert $\geq 6,5\%$ als gesichert (139). Im Rahmen der Erstdiagnose eines T1D ist bei 90% der Patienten zudem mindestens ein Auto-AK messbar (112). In der Praxis ist hierbei v.a. die Bestimmung der Glutamatdecarboxylase-AK (Anti-GAD-AK) und der Tyrosinphosphatase IA-2-AK (Anti-IA2-AK) von Bedeutung, da jene Kombination bei $> 90\%$ der Patienten mit T1D nachweisbar ist. Insulin-Auto-AK (IAA), Zinktransporter 8-AK (Anti-ZnT8-AK) und Zytoplasmatische Inselzell-AK (ICA) stellen weitere detektierbare AK dar (77, 113, 140). Kinder, die mindestens zwei für T1D typische Auto-AK aufweisen, erkranken mit einer Wahrscheinlichkeit von 84% an T1D (112, 141). Die AK sind häufig schon Jahre vor der Erstmanifestation der Erkrankung nachweisbar (113). Zur Vervollständigung der T1D-Diagnostik zählt zudem das Screening auf weitere Autoimmunerkrankungen (142).

Das Peptid CgA kommt in den sekretorischen Granula der Langerhans-Inselzellen des Pankreas, genauer gesagt in den Alpha- und Beta-Zellen, reichlich vor (1). Untersuchungen zum möglichen Zusammenhang von T2D und Pankreastatin-/CgA-Plasmaspiegeln zeigen keine eindeutige Korrelation (143-146). Diverse Tier- und Zellmodelle zeigen, dass sowohl Pancreastatin (CgA 250-301) und Catestatin (CgA 352-372) den Blutzucker- und Fettstoffwechsel beeinflussen. Während Catestatin die Sensibilität gegenüber Insulin erhöht, stellt Pancreastatin den Gegenspieler von Insulin dar (143). Die genauen Funktionen der Peptide sind in Tabelle 1 beschrieben. CgA-KO-Mäuse präsentieren sich in Studien als adipöse, hypertensive und Insulinsensible Tiere mit erhöhter Katecholaminfreisetzung (143, 147). Nach Verabreichung von Pancreastatin nimmt die Insulinsensibilität allerdings ab (147). Dieses Phänomen kann auch in Ratten-Adipozyten und -Hepatozyten mit erhöhten Pancreastatin-Konzentrationen beobachtet werden (45, 46, 148). In einer Studie mit gesunden männlichen Probanden bewirkt humanes Pankreastatin ebenfalls eine verringerte Glucoseaufnahme (47, 144), weshalb dieses CgA-Derivat eine Rolle in der Pathogenese des T2D spielen kann (45). Die pathophysiologische Aufgabe von CgA in der Entstehung der Autoimmunität in T1D ist des Öfteren Gegenstand von Studien. Obgleich Insulin seit langem als Hauptantigen der autoreaktiven T-Helferzellen (Th) in T1D bekannt ist, sind mittlerweile über 30 weitere Epitope in *Non-obese diabetic* (NOD)-Mäusen und Menschen identifiziert (128, 149). Darunter befindet sich auch CgA und diverse Derivate, wobei der Fokus v.a. auf WE-14 (CgA 342-355) liegt (111, 128, 143, 150, 151). So erkranken NOD-Mäuse mit fehlendem CgA-Antigen verglichen

mit Wild-Typ NOD-Mäusen seltener bis gar nicht an T1D (111). In der Bauchspeicheldrüse jener NOD CgA -/- Mäusen findet sich zudem eine verminderte Anzahl an T-Zellen und über 80% der Langerhans-Inseln weisen keine Zeichen einer Insulinitis auf (111). Das CgA ein wichtiger Trigger in der Pathogenese des T1D ist, verdeutlicht auch der schnelle Krankheitsausbruch nach Übertragung CgA-reaktiver CD4+ T-Zellen auf junge NOD-Mäuse. Dieser bleibt in NOD CgA -/- -Mäusen hingegen aus (111). Die PTM stellt einen weiteren wichtigen Mechanismus in der Entstehung neuer Antigene dar (128, 143, 151). Im Rahmen von zellulärem Stress kommt es vermehrt zu fehlerhaften PTM, die enzymatisch und nicht-enzymatisch bedingt sein können. Dies kann die Affinität des Autoantigens zum MHC-II-Rezeptor erhöhen und so das Zusammenspiel mit den T-Zellrezeptoren beeinflussen (128). Die PTM beweisen sich auch im Zusammenhang mit der Antigenität des CgA-Derivats WE-14 als essentiell (150, 151). Die Reaktion der CD4+ T-Zellklone von NOD-Mäusen auf eine durch die Transglutaminase 2 (TG2) modifizierte Form des WE-14 nimmt um das 2- bis 44-fache abhängig von der T-Zellklonart zu (150). Eine andere Studie zeigt einen signifikanten Unterschied in der INF-gamma-Reaktion auf hohe Konzentrationen von humanem WE-14 zwischen neu diagnostizierten, HLA-DQ8 positiven T1D-Patienten und Kontrollen. Auch hier nimmt die Reaktion nach Modifikation mit TG2 deutlich zu, sodass ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Kollektiven bereits bei niedrigeren Konzentrationen von WE-14 messbar ist (151). Die durch TG2 bedingte Erhöhung der Immunogenität beruht bei T1D vermutlich eher auf einer Querverlinkung als auf der bereits bei CD bekannten Deamidierung (150). Eine atypische Bindung von WE-14 an das MHC-II-Molekül antigenpräsentierender Zellen scheint zudem eine wichtige Rolle in der Bildung als Autoantigen zu spielen (152). Eine neuere Studie entdeckt autoreaktive CD8+ T-Zellen, die auf spezifische Epitope von CgA abzielen und ebenfalls an der Entwicklung der Autoimmunität in T1D beteiligt sein könnten (153).

2.3.1.2 Autoimmun-Polyendokrinopathie

Die Autoimmun-Polyendokrinopathie ist definiert als das Vorhandensein von mindestens zwei autoimmun-bedingten Insuffizienzen endokriner Organe (17, 77).

Die AP ist in vier Formen unterteilt, wobei der Typ I die juvenile AP und die Typen II-IV Subgruppen der adulte AP darstellen (16, 17). Die juvenile AP ist eine seltene (geschätzte Inzidenz 1: 100 000), monogenetisch und autosomal-rezessive vererbte Autoimmunerkrankung, welche sich bereits Kindesalter manifestiert. Das Auftreten

ihrer definierenden Erkrankungen weist eine typische Reihenfolge auf: 1. Chronische mukokutane Candidiasis, 2. Hypoparathyreoidismus und 3. AD. Jene Klinik sorgt auch für die Bezeichnung APECED-Syndrom (autoimmunes-Polyendokrinopathie-Candidiasis-ektodermales-Dystrophie-Syndrom). Zusätzlich werden weitere Autoimmunerkrankungen endokrinen und nicht-endokrinen Ursprungs sowie Asplenie und Cholelithiasis in diesem Patientenkollektiv beobachtet (16, 105, 154). Eine Besonderheit der AP I ist die zugrundeliegende monogenetische Mutation des AIRE-Gens, das für einen Transkriptionsfaktor codiert und maßgeblich an der negativen Selektion der T-Lymphozyten im Thymus beteiligt ist (16, 17, 155, 156).

Der Fokus dieser Studie liegt aufgrund der Kollektivzusammensetzung auf der adulten AP. Zwischen den Manifestationen der endokrinen Autoimmunkrankheiten in AP liegen häufig Jahre bis Jahrzehnte (157). Tabelle 2 listet die Definitionen der drei heterogenen Subgruppen der adulten AP auf. Die Patienten leiden zudem häufig auch an nicht-endokrine Autoimmunerkrankungen (105, 157). AP II-IV gelten mit einer Prävalenz von 1: 20 000 US-Einwohnern und einer Inzidenz von 1,4 - 4,5: 100 000 Einwohnern als seltene Erkrankungen (17). Das weibliche Geschlecht ist dreimal so häufig betroffen und das Manifestationsalter liegt bei ungefähr 40-60 Jahren (17, 105). Die Ätiologie der adulten AP ist Gegenstand aktueller Forschung. Man geht von einem polygenetischen und multifaktoriellem Vererbungsmuster aus, das autosomal-dominant mit unvollständiger Penetranz weitervererbt wird (17, 154).

Die Symptome der adulten AP sind abhängig von dem Typ und der darin zugrundeliegenden Erkrankungen. Eine frühzeitige Diagnose erlaubt eine adäquate Behandlung mittels Hormonsubstitution und symptomatischer Therapie (17).

Tabelle 2 Übersicht der adulten Autoimmun-Polyendokrinopathie (modifiziert nach (16, 17, 155))

Adulte AP Typ	Definition
II	AD + ≥ 1 endokrine Autoimmunerkrankung (T1D / AIT)
III	T1D + AIT (Ausschluss AD)
IV	≥ 2 organspezifische endokrine Autoimmunerkrankungen, welche nicht Typ II-III entsprechen
Beispiele zusätzlicher nicht-glandulärer Autoimmunkrankheiten	AG, CD, Autoimmunhepatitis, Neurodermitis, Psoriasis, Vitiligo, Alopezie, rheumatoide Arthritis

AD = M. Addison, AG = Autoimmungastritis, AIT = Autoimmunthyreopathie, AP = Autoimmun-Polyendokrinopathie, CD = Zöliakie, T1D = Typ 1 Diabetes mellitus

Man geht von einer hohen Dunkelziffer an AP-Patienten aus, sodass die geschätzte Inzidenz bei 1: 20 000 liegt (16, 158). Die frühzeitige Diagnosestellung ist schwierig, jedoch entscheidend zur Vermeidung schwerwiegender Komplikationen (105). Aktuell wird bei allen Patienten mit einer MGA ein serologisches Screening auf sowohl glanduläre (v.a. T1D und AD) als auch nicht-glanduläre Auto-AK empfohlen. Sind jene AK positiv, sollte ein funktionales Screening zur Bestätigung einer Drüseninsuffizienz erfolgen (17, 105). Den Auto-AK kommt hierbei eine besondere Rolle zu, da jene häufig schon vor der klinischen Manifestation nachweisbar sind (141, 159). Regelmäßige Kontrolluntersuchungen sowie die Untersuchung von Familienmitgliedern ersten Grades in spezialisierten Zentren sind Teil des essentiellen Früherkennungsprogramms einer AP (16, 17).

Die Bedeutung von CgA für die adulte AP ist in bisherigen Studien nicht untersucht worden. Die Literaturrecherche ergibt den Einsatz von CgA als immunhistochemischen Marker zur Darstellung des Mangels enteroendokriner Zellen bei Patienten mit juveniler AP mit gastrointestinaler Dysfunktion (160, 161). Bei Patienten mit ungeklärter chronischer Diarrhö und Malabsorption soll laut *Posovszky et al. (2012)* stets auch an eine AP I in Betracht gezogen werden, da diese Symptome in 24% der Patienten vorkommen (161, 162). So kann in einer kontrollierten Studie bei zwei von sieben Patienten mit ungeklärten gastrointestinalen Symptomen und dem Fehlen enteroendokriner und enterochromaffiner Zellen im Schleimhautbiopsat des Kolons ein APECED-Syndrom diagnostiziert werden (160). Als Ursache wird eine Autoaggression gegen das DNES des Gastrointestinaltrakts vermutet (161). Eine weitere Studie zeigt, dass der serologisch messbare Tryptophan-Hydroxylase-AK, welcher gegen die Serotonin-produzierenden enterochromaffinen Zellen gerichtet ist, als möglicher Marker der gastrointestinalen Dysfunktion bei AP I fungiert (163).

2.3.1.3 M. Basedow

M. Basedow, auch bekannt als Graves's disease (GD), ist eine Autoimmunthyreopathie, bei der die Schilddrüse stimulierende Auto-AK eine Hyperthyreose provozieren (164). Die jährliche Inzidenz beträgt 20-50 Fälle pro 100 000 Einwohnern (165). Frauen sind fünfmal so häufig betroffen wie Männer und der Krankheitsbeginn liegt meist zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr (165). Pathophysiologisch liegt der Erkrankung ein Zusammenspiel aus einer genetischen Prädisposition, u.a. basierend auf HLA-Allelen (HLA-DR3 und HLA-DR4), und

Umweltfaktoren zugrunde (164-167). Der Mechanismus der Einflussfaktoren zur Krankheitskonversion bleibt dennoch ungewiss (165, 168). Stimulierende TSH-Rezeptor-AK (TRAK) bewirken über die Bindung an den TSH-Rezeptor der Thyreozyten eine Hyperplasie sowie eine vermehrte Synthese und Sekretion des freien Trijodthyronin (fT3) und Thyroxin (fT4) (164, 169). Der negative Rückkopplungsmechanismus der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsenachse wird hierbei umgangen. Der erhöhte Schilddrüsenhormonspiegel geht u.a. mit einem gesteigerten Stoffwechsel und einer erhöhten Sensibilisierung für Katecholamine einher. Klinisch äußert sich das bspw. in psychomotorischer Unruhe, Gewichtsverlust, Wärmeintoleranz und einer Sinustachykardie. Typische Stigmata der Immunhyperthyreose sind die endokrine Orbitopathie (60%), die Merseburger-Trias (50%) und das prätibiale Myxödem (< 5%) (77, 165). Das Ausmaß der Symptome hängt von der Schwere und Dauer der Hyperthyreose sowie vom Alter des Patienten bei Krankheitsbeginn ab (165). Die thyreotoxische Krise stellt die akute lebensgefährliche Verschlechterung des GD dar (77).

Der Einsatz von Thyreostatika, bevorzugt Methimazol, nach Diagnosestellung ist für 12-18 Monate empfohlen und kann bei einer Normalisierung der TSH und TRAK beendet werden (164). Bei 50% der Patienten kommt es nach einem Auslassversuch nicht zu der erhofften Spontanremission, sodass eine definitive Therapieform wie die Radiojodtherapie oder die totale Thyroidektomie empfohlen wird (164, 165, 170). Eine Hypothyreose soll aufgrund einer möglichen Verschlechterung einer begleitenden endokrinen Orbitopathie streng vermieden werden (77). Zusätzlich kann Bedarf an symptomatischer Therapie wie Beta-Blockern bei Sinustachykardie bestehen (164).

Neben Anamnese und körperlicher Untersuchung beruhen die aktuellen diagnostischen Verfahren des GD überwiegend auf der Bestimmung der Schilddrüsenfunktionsparameter sowie auf der Bestimmung der Auto-AK (165). Im Labor zeigen sich folglich fast immer erhöhte fT3, zu 90% erhöhte fT4 und ein supprimiertes TSH, das auch als Screening-Verfahren verwendet wird (77, 171). TRAK und AK gegen die thyreoidale Peroxidase (Anti-TPO) sind in > 95% und 70% der Fälle erhöht. Die Sensitivität des Lumineszenzbioassays TSA_b für TRAK liegt bei 98% (77). In einer anderen Übersichtsarbeit wird TRAK sogar eine Sensitivität und Spezifität von zirka 99% für GD zugeschrieben (172). Weitere Informationen können mittels bildgebender Verfahren gewonnen werden (77). Der typische Sonographiebefund eines GD zeigt eine vergrößerte, echoarme und hypervaskularisierte Drüse (164, 165).

Der Zusammenhang zwischen erhöhten CgA-Serumkonzentrationen und Hyperthyreose ist lediglich von *Al-Shoumer et al. (2009)* untersucht worden (173). Ihm gelingt der Nachweis, dass CgA-Serumspiegel in Patienten mit unbehandelter Hyperthyreose signifikant höher sind als in behandelten, und dass sich die Werte nach erfolgreicher Behandlung normalisieren. CgA korreliert in dieser Studie zudem signifikant mit fT3 und fT4 (173).

2.3.1.4 Hashimoto Thyreoiditis

Eine autoimmun-induzierte, chronisch lymphozytäre Inflammation und Destruktion der Schilddrüse mit folglich resultierender primärer Hypothyreose wird nach ihrem Erstbeschreiber als HT bezeichnet (17, 18).

HT ist die am häufigsten vorkommende Autoimmunerkrankung und die Hauptursache einer Hypothyreose bei Erwachsenen außerhalb von Jodmangelgebieten (18, 174, 175). Die Inzidenz wird mit 1: 1000 Einwohnern pro Jahr angegeben, wobei ethnische Unterschiede bestehen (18, 176). Die anhand von AK und Schilddrüsenparametern geschätzte Prävalenz beläuft sich auf 46 pro 1000 Einwohnern und nimmt mit dem Alter zu (18, 177). Meist wird die Diagnose HT um das 50. Lebensjahr gestellt (18). Das Geschlechterverhältnis von Frauen zu Männern ist 8:1 (18).

Die genaue Pathogenese der HT ist ungeklärt, vermutet wird auch hier eine Interaktion zwischen Umweltfaktoren (bspw. Jodzufuhr, Nikotinkonsum, Medikamente) und genetischer Prädisposition (bspw. HLA-Allele und *single-nukleotid* Polymorphismen) (18, 174, 178). Pathologisch ist eine Einwanderung von B- und T-Lymphozyten, ihre Organisation in Lymphfollikeln sowie die Zerstörung der Thyreozyten und der fibrotische Umbau der Schilddrüse erkennbar. Auf die Ausprägung weiterer Unterteilungen der HT wird hier aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet (18).

Die fortschreitende Entzündung verläuft meist inapparent und wird erst im Rahmen der entstandenen Hypothyreose symptomatisch. Klinische Zeichen hierfür sind bspw. Adynamie, Konzentrationsschwierigkeiten, ein gesteigertes Kälteempfinden, Bradykardie, Gewichtszunahme, Obstipation sowie das charakteristische Myxödem. Auch lokale Symptome, wie durch Kompression bedingte Dysphonie und Dyspnoe, treten auf (18, 77). Ziel der täglichen Substitutionstherapie mit Levothyroxin und der lebenslangen Kontrolluntersuchungen ist die Vermeidung der Symptome (77, 179). Trotz der Häufigkeit der Erkrankung erfolgt die Diagnosestellung oft verzögert (18). Diagnostisch wegweisend ist neben der Klinik der Nachweis von Auto-AK gegen Thyreoglobulin und die TPO, welche häufig schon vor klinisch auffälliger Hypothyreose

messbar sind (180). Der TPO-AK gilt aktuell als bester serologischer Marker der HT mit einer hohen Spezifität und Sensitivität (95%) (18). Zudem besteht ein Zusammenhang zwischen dem TPO-AK und der Hypoechogenität im sonographischen und der Anzahl an autoaggressiven Lymphozyten im pathologischen Befund (18, 181). Thyreoglobulin-AK sind in 70% der HT-Patienten positiv (18, 77). Im Serum fallen erhöhte basale TSH-Werte sowie peripher erniedrigte Schilddrüsenhormone (fT3, fT4) auf (77). Initial kann es jedoch aufgrund der Zerstörung der Thyreozyten zu erhöhten fT3-, fT4-Serumspiegeln kommen (18, 182). Die Diagnose einer HT kann durch einen diffusen und echoarmen Befund in der Schilddrüsen-sonographie und im Zweifel durch eine Szintigraphie bestätigt werden (77).

Lediglich eine Studie aus dem Jahr 1990 hat als Nebeneffekt einer Norepinephrin-Bestimmung, die CgA-Plasmaspiegel bei Patienten mit Hypothyreose bestimmt sowie ausgewertet und dabei keinen signifikanten Unterschied zwischen jenem Kollektiv und der gesunden Kontrollgruppe festgestellt (183).

Laut zwei aktuellen Studien entwickeln Patienten mit autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen häufig (33,3%-36,5%) eine AG mit teilweise folgender ECL-Zellhyperplasie (11,6-17,5%) (184, 185). Weitere Untersuchungen widmen sich demnach der Bedeutung von CgA zur Vorhersage einer ECL-Zellhyperplasie des Magens und der Risikoevaluation eines Magen-NET in HT-Patienten (184, 186).

In Patienten mit HT, welche in den prospektiven Studien eine AG bzw. ECL-Zellhyperplasie diagnostiziert bekommen, sind signifikant höhere CgA-Werte messbar als in reinen HT-Patienten. Dennoch erweist sich Gastrin in diesen Studien als besserer Vorhersageparameter einer ECL-Zellhyperplasie (184, 186).

2.3.1.5 M. Addison

AD beschreibt die primäre Nebennierenrindeninsuffizienz, welche in 80% der Fälle durch eine Autoimmunadrenalitis bedingt ist (17, 77, 187, 188).

Die Erkrankung weist in Deutschland eine Prävalenz von 8,7 pro 100 000 Einwohner auf und zeigt v.a. bei Frauen eine Zunahme (19, 189, 190). Ungefähr 40% der Autoimmunadrenalitiden treten isoliert auf, mehr als die Hälfte der Patienten mit AD leidet jedoch unter einer AP (19, 188).

Pathophysiologisch hat die Zerstörung der Nebennierenrinde (NNR) eine verminderte bis fehlende Synthese der Mineral- und Glukokortikoide sowie des

Dehydroepiandrosteron (DHEA) zur Folge (19, 188). Die daraus folgende Klinik mit Adynamie, Gewichtsverlust und Dehydratation, Hypotonie und Hyperpigmentierung tritt meist erst auf, wenn bereits 90% der NNR zerstört ist. Das Defizit an Aldosteron und Androgenen äußert sich in Salzhunger sowie Verlust von Libido und Sekundärbehaarung. Letzteres wird besonders bei Frauen deutlich (19, 77, 187). Die Addison-Krise stellt die gefürchtetste und lebensgefährliche Komplikation der primären NNR-Insuffizienz dar, welche es mittels suffizienter Substitutionstherapie zu vermeiden gilt (190, 191). Die Einnahme von Hydrocortison ersetzt die fehlende Glukokortikoidsynthese (19, 187, 192). Die Dosierung erfolgt vorrangig anhand der Klinik und muss stets an Belastungssituationen angepasst werden, um schwerwiegende Komplikation zu vermeiden (188, 191, 192). Fludrocortison dient als Mineralkortikoid und unterliegt geringeren Schwankungen (19). Die DHEA-Substitution ist fakultativ und symptomabhängig (19).

Die Diagnose eines AD wird häufig aufgrund nicht-spezifischer Symptome und der Seltenheit der Erkrankung erst spät gestellt (19, 188). Laborchemisch fällt in der basalen morgendlichen Hormonbestimmung ein erniedrigter Serum-Cortisol-Spiegel bei erhöhten ACTH-Werten auf (19, 192). Auch eine Hyponatriämie und Hyperkaliämie sowie eine metabolische Azidose sind sichtbar. Zusätzlich gelingt bei 90% der Patienten mit Autoimmunadrenalitis der Nachweis von Auto-AK, am häufigsten gegen die 21-Hydroxylase (77, 193). Der fehlende Anstieg des Serumcortisolspiegels im ACTH-Stimulationstest bestätigt schließlich die Diagnose eines AD (188).

Bisher ist nur eine Studie bekannt, die den klinischen Nutzen von CgA als serologischen Marker der primären NNR-Insuffizienz untersucht. Im Rahmen der Diskussion wird später genauer auf diese Studie eingegangen (194).

2.3.2 Gastrointestinale Autoimmunerkrankungen und Chromogranin A

2.3.2.1 Autoimmungastritis

Die AG beschreibt eine autoimmun-bedingte progrediente Zerstörung der Parietalzellen mit resultierender atrophierter und metaplastischer Mukosa des Magenkorporus/-fundus. Die perniziöse Anämie gilt als Spätmanifestation der AG (107, 195, 196).

Angaben zur Prävalenz sind aufgrund wenig verlässlicher Daten und jahrelangem asymptomatischem Verlauf schwer zu treffen (107, 196). Weltweit handelt es sich um eine unterdiagnostizierte Erkrankung (106, 107), welche entgegen älteren Vermutungen keine ethnische Häufung aufweist (107, 195). Frauen sind dreimal so häufig betroffen wie Männer (106). Letzte Schätzungen sprechen von einer Gesamtprävalenz der AG und perniziösen Anämie von 2% und 0,1%. Bei älteren Frauen liegt die AG-Prävalenz bei 4-5%, die der perniziösen Anämie bei über 60-Jährigen bei 2% (107, 197, 198).

Die Ursache der AG ist bis dato nicht vollständig verstanden. Es handelt sich auch hier um ein Zusammenspiel aus genetischen und Umweltfaktoren (106, 107). Das Bakterium *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) wird als möglicher Trigger diskutiert, da jene Infektion häufig zeitgleich oder vor der AG auftritt (107, 196, 199). Als Mechanismus werden ein molekulares Mimikry und die Aktivierung autoreaktiver T-Zellen vermutet (107, 200-203). Pathophysiologisch sorgen Auto-AK gegen die H⁺-K⁺-ATPase der Parietalzellen des Magenkorporus/-fundus und autoaggressive T-Zellen für eine Destruktion eben jener Magendrüsen, die in einer Atrophie des Fundus/Korpus ohne Einbezug des Antrums mündet (107, 196, 204). Folglich kommt es aufgrund einer verringerten bis fehlenden Säuresekretion der Parietalzellen zu einem pH-Anstieg (196). Dies geht zum einen mit einer vermehrten Kolonisierung durch Bakterien und zum anderen mit einer verminderten Absorption nicht-organischen Eisens und Vitamin B12 einher (107, 196). Die Hypochlorhydrie löst zudem eine Hypergastrinämie durch die G-Zellen des Antrums bei fehlendem negativem Feedback aus, welche eine Hyperplasie der ECL-Zellen des Magens mit möglicher Entstehung von NET zur Folge hat (107, 205, 206). Ein Mangel an Intrinsic Faktor (IF) ist typisch für eine AG. Dies beruht sowohl auf der Zerstörung der IF-produzierenden Parietalzellen als auch auf spezifischen IFA (Intrinsic Faktor-Antikörper). Der IF-Mangel resultiert in einer verminderten Resorption von Vitamin B12 im terminalen Ileum und kann langfristig in einer perniziösen Anämie münden (107, 195).

Die AG zeichnet sich durch keine spezifischen Symptome aus und verläuft aufgrund einer progredienten Entwicklung meist lange Zeit asymptomatisch (106, 107). Die mikrozytäre Eisenmangelanämie ist die häufigste hämatologische Symptomatik der AG. Sie tritt meist Jahre vor der perniziösen Anämie auf und betrifft v.a. Frauen und jüngere Patienten (107, 196, 207). Bei einem refraktären Verhalten trotz oraler Eisensubstitution sollte stets auch eine AG in Betracht gezogen werden (106, 196, 208-210). Diverse Studien zeigen, dass 15-30% der Patienten mit Eisenmangelanämie ursächlich an einer AG leiden (195, 196, 208, 211-213). Mögliche Symptome des Eisenmangels sind die allgemeine Leistungsminderung, Blässe und kardiale Symptome wie Palpitationen (107, 195). Die durch einen Vitamin B12-Mangel bedingte perniziöse Anämie tritt meist erst im fortgeschrittenen Stadium der AG und gehäuft bei älteren Patienten auf (195, 196). Weitere Symptome eines ausgeprägten Vitamin B12-Mangels sind sowohl neurologischer (bspw. periphere Neuropathie, Ataxie, Depression, Gedächtnisverlust) als auch gastroenterologischer Natur (Diarrhö, Malabsorption, atrophische Glossitis) (195, 196). Patienten mit AG haben ein erhöhtes Risiko ein Typ 1 Magenkarzinoid, welches mit einer guten Prognose einhergeht, oder ein intestinales Magenkarzinom (relatives Risiko bei Patienten mit perniziöser Anämie 6,8; 95%-Konfidenzintervall (KI) 2,6-18,11 (214)) zu entwickeln. Die ECL-Zellhyperplasie sowie die intestinale Metaplasie, welche im Rahmen der AG vermehrt entstehen, stellen hierbei präkanzeröse Läsionen dar (106, 196, 215).

Ziel einer frühzeitigen Diagnose und adäquaten Therapie ist die Prävention einer perniziösen Anämie sowie weiterer Vitaminmangelerscheinungen (Eisen, Folsäure) mittels Substitution und die endoskopische Überwachung möglicher dysplastischer Läsionen (106, 107, 195, 216). Falls zeitgleich ein H. pylori-Nachweis vorliegt, gilt es, eine Eradikationstherapie durchzuführen, welche mit einer Abnahme der AK-Spiegel einhergehen kann (106, 217).

Die AG wird häufig im Rahmen der Abklärung eines Vitamin B12-Mangels, neurologischer Symptome, assoziierter Autoimmunerkrankungen oder als Zufallsbefund bei Magenbiopsien diagnostiziert (195, 218). Die Kombination histopathologischer und serologischer Befunde hat sich als aktuell beste Methode bewährt (107). Die Ösophagogastroduodenoskopie (ÖGD) dient hierbei v.a. der Befundgewinnung, wobei jeweils zwei separat gelagerte Biopsien des Antrums und Korpus entnommen werden sollten (107, 200, 219, 220). Die Histologie ist abhängig vom Krankheitsstadium. In der Frühphase ist eine lymphozytäre und plasmatische Infiltration der Mukosa einschließlich der Lamina propria typisch. Mit zunehmender

Atrophie der Drüsen bedingt durch den Verlust der Parietalzellen zeigt sich vermehrt eine pseudopylorische und intestinale Metaplasie sowie eine ECL-Zellhyperplasie. Die Inflammation ist in der Endphase meist nur noch geringfügig sichtbar. Dieser Prozess bleibt bei der AG auf den Magenkorpus und -fundus beschränkt (106, 107, 195, 221). Zur serologischen Diagnostik werden die IFA und Parietalzell-Antikörper (PCA) verwendet, die meist schon Jahre vor Erstmanifestation positiv messbar sind (196, 222). PCA gilt als sensitivster Serumbiomarker der AG (Sensitivität 81%, Spezifität 90%) (196, 223). IFA hingegen ist spezifischer (100%), jedoch weniger sensitiv (27%) (223, 224). Im Krankheitsverlauf ist eine Serokonversion sowie eine erhöhte Sensitivität von IFA möglich (106, 196). Im Labor sind zudem häufig erhöhte Gastrinwerte, ein erniedrigtes Pepsinogen I und im Falle einer perniziösen Anämie erniedrigte Hämoglobin-Werte mit erhöhtem mittleren korpuskulären Volumen (MCV) sichtbar (106, 107). Die zusätzliche Bestimmung der *H. pylori*-AK sowie die Abklärung weiterer assoziierter Autoimmunerkrankungen wie der Autoimmunthyreopathie (AIT), des T1D und des AD wird empfohlen (106, 107, 195, 196).

In der Literatur finden sich einige Studien, die sich der klinischen Bedeutung von CgA für die Erkennung von ECL-Zellhyperplasien und Magenkarzinoiden bei Patienten mit AG widmen. Die Gastrin-produzierenden G-Zellen des Antrums und die ECL-Zellen des Korpus und Fundus sind die am häufigsten vorkommenden endokrinen Zellen des Magens (62, 225, 226). Dies bedingt, dass die im Rahmen einer AG stattfindende Atrophie und Inflammation der Korpus-/Fundusmukosa und die daraus resultierende Hypergastrinämie und ECL-Zellhyperplasie zu erhöhten CgA-Blutkonzentrationen führt (63, 226, 227). In einer Studie von *Kleveland et al. (2001)* weisen 88,5% der Probanden mit Hypergastrinämie erhöhte CgA-Spiegel auf (226). Es wird vermutet, dass sezerniertes Pancreastatin die ECL-Zellaktivität und das Gesamtprotein CgA die ECL-Zellzahl widerspiegelt (226, 228).

CgA korreliert in AG signifikant mit der ECL-Zellmasse (62, 63, 69). Während *Kalkan et al. (2016)* einen signifikanten Unterschied der CgA-Konzentrationen bei AG-Patienten mit bzw. ohne ECL-Zellhyperplasie feststellen kann ($p < 0,001$) (227), gelingt das *Peracchi et al. (2005)* nicht (62). Eine Untersuchung von 318 Probanden, darunter 188 Patienten mit AG, definiert die ECL-Zellhyperplasie (OR 6,59; 95%-KI 1,4-31,08; $p = 0,017$) sowie die Korpusatrophie (OR 5,03; 95%-KI 1,21-29,88; $p = 0,026$) als unabhängige Einflussfaktoren für erhöhte zirkulierende CgA-Werte (227). Eine anhand

von 43 AG-Patienten durchgeführte Studie ergibt jedoch keine signifikante Korrelation von CgA mit dem Schweregrad der Atrophie (63).

Der alleinige Einsatz der CgA-Bestimmung zur Detektion von Magenkarzinoiden erweist sich aufgrund eines fehlenden signifikanten Unterschiedes der CgA-Spiegel in Patienten mit AG und Magenkarzinoiden sowie der geringen Spezifität als nicht zielführend (62, 227).

Wissenschaftler gehen zudem davon aus, dass die hohen CgA-Spiegel auch zum Teil durch die G-Zellen selbst bedingt sein können. Dies beruht auf der Beobachtung, dass in Patienten mit Gastrinomen erhöhte CgA-Blutkonzentrationen messbar sind, obwohl keine ECL-Zellhyperplasie in der Histologie nachgewiesen wird (62, 227, 229). Andere sind jedoch der Meinung, dass auch diese Konzentrationserhöhung zum Großteil auf der ECL-Zellhyperplasie beruht, die teilweise aufgrund ihrer unregelmäßigen Verteilung in Biopsien schwer erkennbar ist (62, 230). Diese Annahme wird durch die Beobachtung regredienter CgA-Werte nach Gastrektomie ohne Entnahme des Gastrinoms gestützt (31, 231).

2.3.2.2 Zöliakie

Die CD ist eine entzündliche Dünndarmerkrankung, deren T-Zell gesteuerte Autodestruktion durch die Aufnahme glutenhaltiger Nahrung getriggert ist (20, 108). In der Literatur ist die Erkrankung auch unter dem Namen glutensensitive Enteropathie oder einheimische Sprue bekannt (77).

Die geschätzte Prävalenz der CD in Europa liegt bei 1% (20). Die Anzahl der nicht diagnostizierten Patienten ist sehr hoch, meist findet die Diagnosestellung erst vier Jahre verzögert statt (20, 232).

Die Pathogenese der CD ist gut erforscht und verstanden. Weist ein Patient die passende genetische Prädisposition in Form der Klasse-II-HLA-Allele (HLA-DQ2 und/oder HLA-DQ8) und mögliche Umweltfaktoren (Medikamente, Infektionen, Zeitpunkt der ersten Gluten-Einnahme) vor, kann das Speicherprotein Gluten eine schwerwiegende Immunreaktion bewirken (20, 108, 233-235). Das in zahlreichen Nahrungsmitteln vorkommende Gluten gelangt nach unvollständiger Zersetzung über das Dünndarmepithel in die Lamina propria. Seine Gliadin- und Gluteninpeptide werden dort von antigenpräsentierenden Zellen erkannt. Sie stimulieren passende T-Zellen, welche wiederum eine Zytokin-vermittelte zelluläre und humorale Gewebsdestruktion auslösen. Histologisch ist schließlich eine intraepitheliale Lymphozytose, eine Kryptenhyperplasie sowie eine Zottenatrophie sichtbar. Die TG2

steigert die Immunogenität der Peptide, indem sie ihre Bindungsaffinität und Lebensdauer durch eine Deamidierungsreaktion erhöht (20, 236, 237).

Die Manifestation der CD ist vielfältig. Von einer klassischen CD spricht man, sofern Patienten über gastrointestinale Symptome wie Malabsorption, Diarrhö und Bauchschmerzen klagen. Im Kindesalter kann dies häufig zu einer Gedeihstörung führen (20, 238, 239). Über 80% der Betroffenen weisen atypische, häufig extraintestinale Symptome wie Anämie, Osteoporose, Infertilität, Kopfschmerzen und Stimmungsschwankungen auf (20, 108). Die Klinik kann auch im Zusammenhang mit assoziierten weiteren Autoimmunerkrankungen wie T1D, AIT und AP III stehen, welche laut einer Studie bei 14% der CD-Patienten auftreten (20, 240, 241).

Eine besondere Herausforderung stellt die refraktäre CD dar, die durch eine ausbleibende Besserung trotz glutenfreier Ernährung definiert ist (108, 238). Während der Typ 1 benigne ist, erkranken Patienten mit Typ 2 in 50% der Fälle an einem enteropathieassoziiertem intestinalen T-Zell-Lymphom (108, 242-244). Alle unzureichend therapierten CD-Patienten weisen ein erhöhtes Risiko für gastrointestinale Malignome auf (238, 239).

Die derzeitige Therapie der Wahl ist der lebenslange Verzicht auf glutenhaltige Nahrung. Dies sorgt innerhalb von Wochen für eine Reduktion der Symptome, innerhalb von Monaten für eine Normalisierung der AK und innerhalb von Jahren für einer Regenerierung des Gewebes. Aktuell wird an der Entwicklung pharmakologischer Substanzen zur Therapie der CD gearbeitet (20, 108, 236).

Laut Leitlinie kann die Diagnose CD mittels einer AK-Bestimmung, Histologie und Reaktion auf eine glutenfreie Ernährung gestellt werden (20, 239). Bei Verdacht auf CD oder erhöhtem Risiko (Verwandte 1. Grades) wird die serologische Bestimmung der TG2-IgA-AK, der Endomysium-IgA-AK und des Gesamt-IgA empfohlen. Im Falle eines IgA-Mangels (2% der CD-Patienten) müssen zusätzlich TG2-IgG-AK und IgG-AK gegen deamidiertes Gliadin gemessen werden. Der Goldstandard der Diagnostik liegt in der ÖGD mit Biopsieentnahme und anschließender histologischer Untersuchung. Die Diagnose CD gilt ab einem Stadium Marsh II (alleinige Kryptenhyperplasie) in Kombination mit positiver Serologie als gesichert. Häufiger wird eine Marsh III und somit das zusätzliche Vorhandensein einer Zottenatrophie beschrieben. Zu beachten gilt, dass die Bestimmung der AK und die Beurteilung der Histologie nur unter glutenhaltiger Ernährung und kurze Zeit danach aussagekräftig ist. Die HLA-Typisierung ist bei widersprüchlichen Befunden oder langanhaltender

glutenfreier Diät ohne vorherige Diagnosesicherung von Bedeutung und kann dem nahezu völligem Ausschluss der Erkrankung dienen (20, 108, 239, 245).

Einige Studien widmen sich der Bestimmung neuroendokriner Zellen bei CD (246-251). Ein Anstieg dieser Zellart in der Dünndarmschleimhaut der Patienten mit unbehandelter sowie refraktärer CD ist ermittelt worden, wobei letztere nicht nur signifikant höhere Werte als die behandelte CD und die gesunde Kontrollgruppe haben, sondern auch als das unbehandelte Patientenkollektiv (252). Hierbei wird u.a. CgA als immunhistochemischen Marker verwendet (246, 247, 252).

3. Material und Methoden

Der nachfolgende Abschnitt erläutert den Studienaufbau, die Methode der CgA-Bestimmung sowie die verwendeten statistischen Verfahren dieser Studie.

3.1 Datenerfassung

807 Probanden wurden im Rahmen dieser retrospektiven Querschnittstudie in der Ambulanz der Endokrinologie der Universitätsmedizin in Mainz bei ■■■■■ untersucht.

Die Auswahl der Probanden erfolgte auf Basis einer Gesamtliste aller Patienten, die nach folgenden Kriterien gefiltert wurde: Kollektiv, Alter der Blutprobe (2002 und jünger), Geschlechterverhältnis und ausgewogenes Durchschnittsalter pro Kollektiv. Die relevanten Daten der Probanden, wie demographische und serologische Parameter sowie Informationen über Begleiterkrankungen und Medikamenteneinnahme wurden in einer pseudonymisierten Tabelle erfasst. Diese Daten wurden einerseits den Patientenakten entnommen, andererseits im Labor bestimmt.

3.1.1 Kollektive

Die Probanden wurden nach klinischen und labordiagnostischen Kriterien ihrem jeweiligen Kollektiv zugeteilt (*Tabelle 3*).

Überschneidungen zwischen den Kollektiven wurden minimiert, waren jedoch aufgrund der starken Verbindung zwischen Autoimmunerkrankungen unvermeidlich. Aufgrund der anonymen Analyse der Daten und dem Gebrauch von Überschussmaterial von Blutproben der Routinediagnostik war keine weitere Genehmigung des medizinischen Ethik-Komitees erforderlich. Die Patienten, im Falle Minderjähriger deren Erziehungsberechtigte, hatten zuvor in Übereinstimmung mit dem Ethik-Komitee Rheinland-Pfalz der wissenschaftlichen Verwendung des Überschussmaterials zugestimmt.

Tabelle 3 Kollektivübersicht und Diagnosekriterien (Kriterien nach (253))

Kollektiv	Anzahl	Diagnosekriterien
T1D	56	Insulin-Abhängigkeit, Nüchtern-glucose-Spiegel > 120 mg/dl, pathologisches Serum-HbA1c > 6,5%, IAA und/oder ICA und/oder Anti-GAD-AK und/oder Anti-IA2-AK
AP	98	Kombination zweier autoimmunbedingter endokriner Erkrankungen
GD	89	Hyperthyreose, TRAK, typischer Ultraschallbefund mit vermehrter Vaskularisation der Schilddrüse
HT	85	Hypo-/ Euthyreose, mind. fünffach erhöhte Serumspiegel der TPO-AK, echoarmer Ultraschallbefund der Schilddrüse
AD	30	Kombination aus niedrigem Serum-Cortisol Basalwert (< 0,1 µg/dl), pathologisch erhöhtem Serum-ACTH Basalwert, deutlich erhöhtem Anstieg des Serum ACTH-Wertes nach Stimulation (Δ 50 pg/ml) und AK gegen Cytochrome P450-21-Hydroxylase
AG	112	PCA oder IFA, histologisch sichtbare Atrophie der Magenschleimhaut sowie intestinale Metaplasie
CD	85	Serum IgA (bei IgA-Mangel IgG)-AK gegen Gewebstransglutaminase und IgA/IgG Gliadin-AK teilweise mit Histologie
NET	32	Chirurgisch und histologisch gesicherter NET jeglicher Art
TN	82	Klinisch und sonographisch diagnostizierter Schilddrüsenknoten (mind. einer)
Rel	89	Angehörige von Patienten mit Autoimmungastritis
C	49	Probanden ohne persönliche oder familiäre Geschichte einer autoimmun, tumorösen oder chronisch-inflammatorischen Erkrankung
Total	807	

AD = M. Addison, AG = Autoimmungastritis, Anti-GAD-AK = Glutamatdecarboxylase-Antikörper, Anti-IA2-AK = Tyrosinphosphatase IA-2-Antikörper, AP = Autoimmun-Polyendokrinopathie, C = gesunde Kontrollgruppe, CD = Zöliakie, GD = M. Basedow, HbA1c = Glykohämoglobin, HT = Hashimoto Thyreoiditis, IAA = Insulin-Auto-Antikörper, ICA = Zytoplasmatische Inselzell-Antikörper, IFA = Intrinsic Faktor-Antikörper, mind. = mindestens, NET = Neuroendokriner Tumor, PCA = Parietalzell-Antikörper, Rel = Angehörige von Autoimmungastritis Patienten, TN = Schilddrüsenknoten, TPO-AK = Antikörper gegen die thyreoidale Peroxidase, TRAK = TSH-Rezeptor-Antikörper, T1D = Typ 1 Diabetes mellitus

3.1.2 Laborparameter

Der CgA-Serumspiegel wurde mithilfe des Immunoassays BRAHMS Kryptor compact plus (ThermoFisher SCIENTIFIC BRAHMS GmbH, Henningsdorf, Deutschland) im endokrinologischen Labor von [REDACTED] analysiert.

Um die Rolle von CgA in AG genauer zu untersuchen, war die Erfassung der Gastrin-, PCA- und IFA-Werte notwendig. Die Patientenakten wurden auf bereits im Zentrallabor der Universitätsmedizin Mainz bestimmte Parameter untersucht. Fehlende Daten wurden dort auf Anfrage nachbestimmt. Serum-Gastrin wurde mithilfe des Chemiluminescenceimmunoassays (CLIA) bestimmt (254). PCA und IFA wurden gemäß der Herstellerangaben von EUROPLUS® Magen (Affe)/Intrinsic Factor (EUROIMMUN AG, Lübeck, Deutschland) gemessen (255).

Tabelle 4 Laborparameter mit Skalenniveau und Referenzwerten

Laborparameter	Skalenniveau	Referenzwerte
Chromogranin A (71)	binär & stetig	< 98 ng/ml
Gastrin (254)	stetig	13 - 115 pg/ml
Parietalzell-Antikörper	binär	negativ
Intrinsic Faktor-Antikörper	binär	negativ

3.2 Material

3.2.1 Analysegerät

Zur Bestimmung der CgA-Serumspiegel wurde der erste vollautomatisierte *Random-Access-Immunoanalyzer* BRAHMS KRYPTOR compact PLUS der Firma ThermoFisher Scientific BRAHMS GmbH (Hennigsdorf, Deutschland) verwendet. Das System basiert auf der von Jean-Marie Lehn entwickelten *Time Resolved Amplified Cryptate Emission* (TRACE)-Technologie, die das von einem Immunkomplex ausgehende Fluoreszenzsignal zeitverzögert misst (256).



Abbildung 2 BRAHMS KRYPTOR compact PLUS (257)

3.2.2 Serumbloodproben

Die Serumbloodproben aller Probanden, abgesehen der NET-Patienten, wurden bei -20 Grad Celcius (°C) bis zur Analyse von CgA im endokrinologischen Labor von ■■■■■ gelagert. Die Blutentnahme erfolgte nach einer 12-stündigen Fastenperiode. Im Anschluss wurde das Blut für 10 Minuten (min) (bei 4000 g und Raumtemperatur) zentrifugiert. Die Serumbloodproben wurden vor der Analyse im Wasserbad bei 35-38°C aufgetaut.

3.2.3 Verbrauchsmaterial

Tabelle 5 Testkit BRAHMS Chromogranin A (CgA) II Kryptor (258)

Material	Beschreibung	Hersteller
K-Konjugat	Monoklonaler anti-CgA-Antikörper konjugiert mit Kryptat, Puffer, Rinderalbumin, Immunglobuline Rind, Immunglobuline Maus, Trehalose, Mannitol	Thermo Fisher Scientific BRAHMS GmbH; Hennigsdorf, Deutschland
XL-Konjugat	Monoklonaler anti-CgA-Antikörper konjugiert mit Alexa Fluor 647, Puffer, Rinderalbumin, Immunglobuline Rind, Immunglobuline Maus, Kaliumfluorid	Thermo Fisher Scientific BRAHMS GmbH; Hennigsdorf, Deutschland
Diluent	Humanserum, Kathon, EDTA	Thermo Fisher Scientific BRAHMS GmbH; Hennigsdorf, Deutschland
Barcodekarte	Informationen zur Registrierung einer neuen Reagenzcharge	Thermo Fisher Scientific BRAHMS GmbH; Hennigsdorf, Deutschland

Tabelle 6 Verbrauchsmaterial BRAHMS KRYPTOR compact PLUS (258, 259)

Material	Hersteller
<i>Waschflüssigkeit:</i> BRAHMS KRYPTOR compact BUFFER	Thermo Fisher Scientific BRAHMS GmbH; Hennigsdorf, Deutschland
Destilliertes Wasser	Fresenius Kabi; Bad Homburg v.d.H, Deutschland
Reagenzienkassette	Thermo Fisher Scientific BRAHMS GmbH; Hennigsdorf, Deutschland
<i>Lösungen:</i> BRAHMS KRYPTOR compact SOLUTION 1-4	Thermo Fisher Scientific BRAHMS GmbH; Hennigsdorf, Deutschland
<i>Verdünnungsplatten:</i> BRAHMS KRYPTOR compact DILCUP	Thermo Fisher Scientific BRAHMS GmbH; Hennigsdorf, Deutschland
<i>Reaktionsplatte:</i> BRAHMS KRYPTOR compact REACT	Thermo Fisher Scientific BRAHMS GmbH; Hennigsdorf, Deutschland

Tabelle 7 Sonstiges Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
5 ml Tubes	Sarstedt AG & Co.; Nümbrecht, Deutschland
Pipetten (200 µl, 1000 µl)	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland
Eppendorf Tube	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland

3.2.4 Software

Tabelle 8 Softwareinformationen

Software	Hersteller
EndNote X9.2	Clarivate Analytics; Philadelphia, USA
IBM SPSS Statistics 22.0v / 23.0v	IBM Corporation; Armonk, USA
Lauris Client; Medizinisches Leistungsanforderungs- und Reportsystem Version 13.03.22.6 (09.01.2014), Release 2013_01	Hoffmann-La Roche; Basel, Schweiz
Microsoft Excel für Mac 2011	Microsoft Corporation; Redmond, USA
Microsoft Remote Desktop for MAC OSX	Microsoft Corporation; Redmond, USA
Microsoft Word Office 365-Abonnement 2019	Microsoft Corporation; Redmond, USA
SAS Software Version 9.4	SAS Institute Inc.; Cary, USA

3.3 Methoden

3.3.1 Chromogranin A-Messung mithilfe des Kryptors

Zu Beginn der Messung müssen die Röhrcchen der Serumblutproben zunächst in die Probenkassette des Karussells gestellt werden. Anschließend wird der BRAHMS KRYPTOR compact PLUS in Betrieb genommen. Die Füllstände der Kanister des Puffers, des destillierten Wassers sowie des Abfallkanisters im Flüssigkeitssystem werden überprüft. Es wird sichergestellt, dass das Gerät kalibriert ist, die tägliche Zwei-Punkt Kontrolle durchgeführt wurde und die Lösungen 1 bis 4 im Karussell stehen.

Nach Durchführung der Kontrollen wird die Proben-ID mit der Kassetten-ID und der Röhrcchenposition auf der Probenkassette des Karussells in die Software eingegeben werden. Anschließend wird das Programm gestartet.

Das Konjugat und 14 µl der gewünschten Serumproben werden in eine 37°C warme Pipettiernadel aufgezogen. Mithilfe von Luftblasen wird der Kontakt zwischen den Bestandteilen CgA, antikörpermarkiertem Kryptat und antikörpermarkiertem Alexa Fluor 647 vermieden. Die AK und das Antigen (CgA) werden bei Abgabe der Substanzen aus der Nadel gemischt. Die Inkubation startet in der Folge automatisch. Zeitgleich mit der ersten Messung (t_0) beginnt die Detektionsphase. Während dieser Phase finden in einem spezifischen Abstand mehrere Messungen statt (t_2/t_m). Liegt eine Konzentration während der Detektionsphase außerhalb des direkten Messbereiches („out of range“) kommt es zur Unterbrechung des Tests. Eine automatische Probenverdünnung wird durchgeführt und die Messung wird erneut gestartet. Am Ende der Inkubationszeit wechselt die Statusfarbe von grün zu blau. Das letzte Signal t_{end} erscheint und die Proben können entfernt werden. Die Ergebnisse können anschließend dem Ergebnisfenster entnommen werden (256, 258-260).

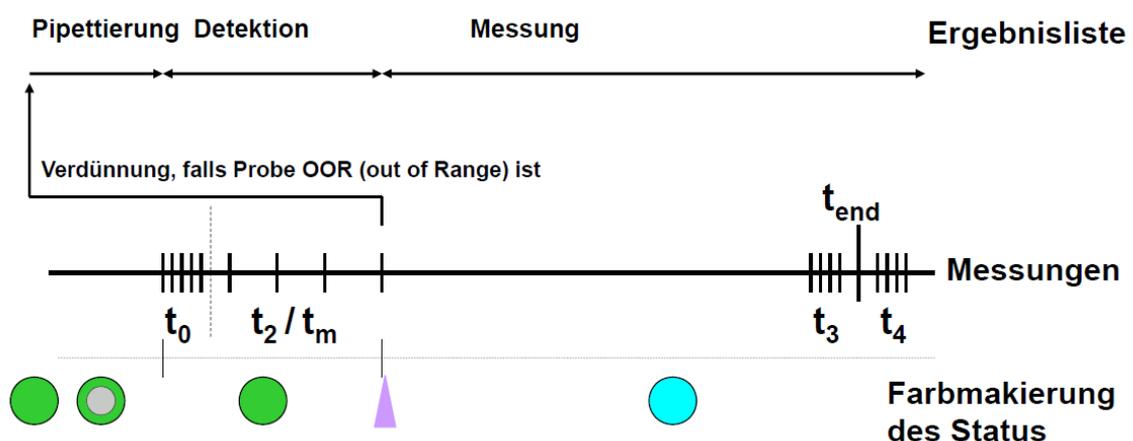


Abbildung 3 Darstellung eines Testdurchlaufs (260)

3.3.2 Messprinzip: TRACE®-Technologie

Die Arbeitsweise des Kryptors beruht auf der zeitverzögerten Messung der Signalemission des Fluorophors im Immunkomplex. Das zu detektierende spezifische Fluoreszenzsignal entsteht infolge eines strahlungsfreien Energietransfer vom Donor auf den Akzeptor. Für die Energieübertragung muss zum einen eine kurze Distanz zwischen Donor und Akzeptor gewährleistet sein. Diese ist im Rahmen des Immunkomplexes (Donor-Antigen CgA-Akzeptor) erfüllt. Zum anderen wird der Transfer durch die Überlappung des Emissionsspektrums des Donors mit dem Absorptionsspektrums des Akzeptors ermöglicht. Das in der Folge entsandte Fluoreszenzsignal unterscheidet sich durch ein langlebiges Signal (μs) und einer Wellenlänge von 647 nm eindeutig vom Donor (Europium Kryptat; 620 nm; μs) und Akzeptor (Alexa Fluor 647; 647 nm; ns) (Tabelle 9). Das gemessene Signal ist somit proportional zur Konzentration von CgA in der Probe. Die TRACE-Methode sorgt über einen 50 μs zeitverzögerten Beginn der Detektion für die Elimination unspezifischer kurzer Signale. Eine Messung besteht aus 20 Laserschüssen à 337 nm, die über einen Stickstofflaser auf die Serumprobe abgegeben werden (256, 258, 260, 261).

Tabelle 9 Eigenschaften der Elemente Europium Kryptat, Alexa Fluor 647 und des Immunkomplexes (modifiziert nach (258, 260))

Element	Anregung	Emission	Stabilität der Emission
Europium Kryptat	337 nm	620 nm	μs
Alexa Fluor 647	337 nm 620 nm	647 nm	ns
Kryptat-CgA-Alexa Fluor-Komplex	337 nm	647 nm	μs

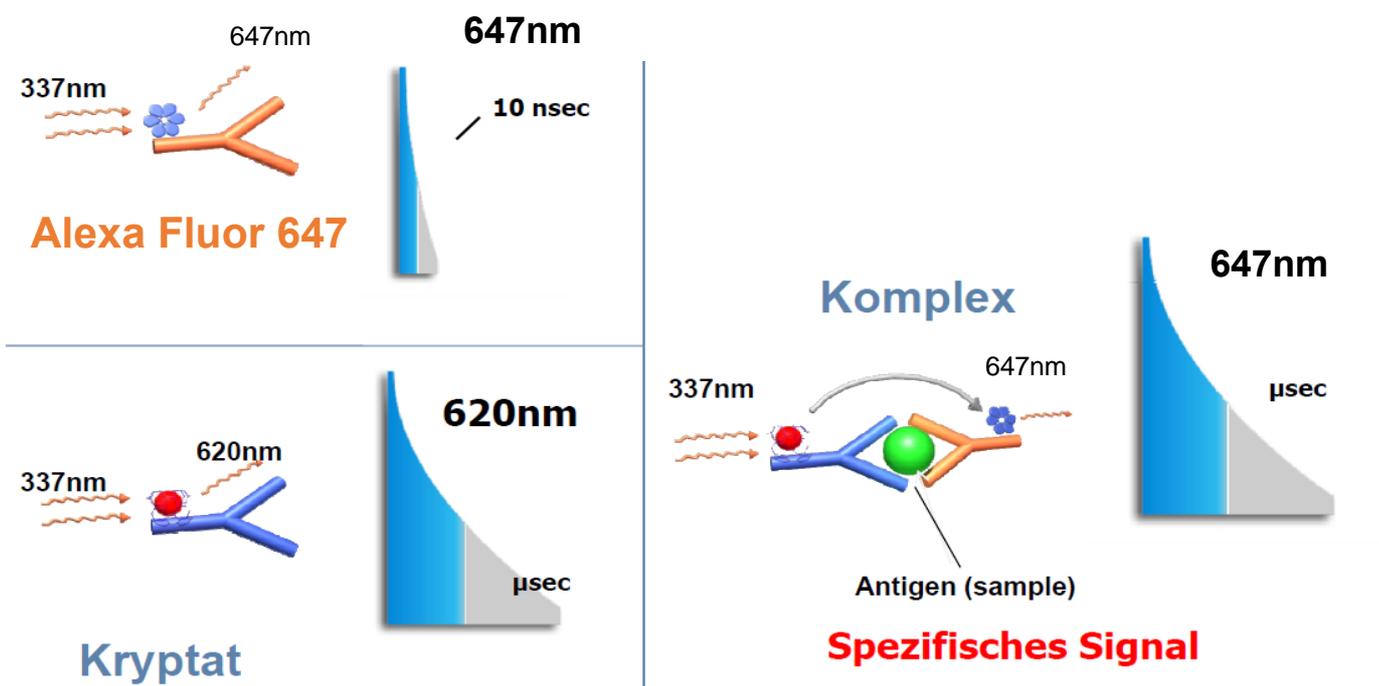


Abbildung 4 Sandwich-Assay BRAHMS Kryptor compact plus (modifiziert nach (258, 260))

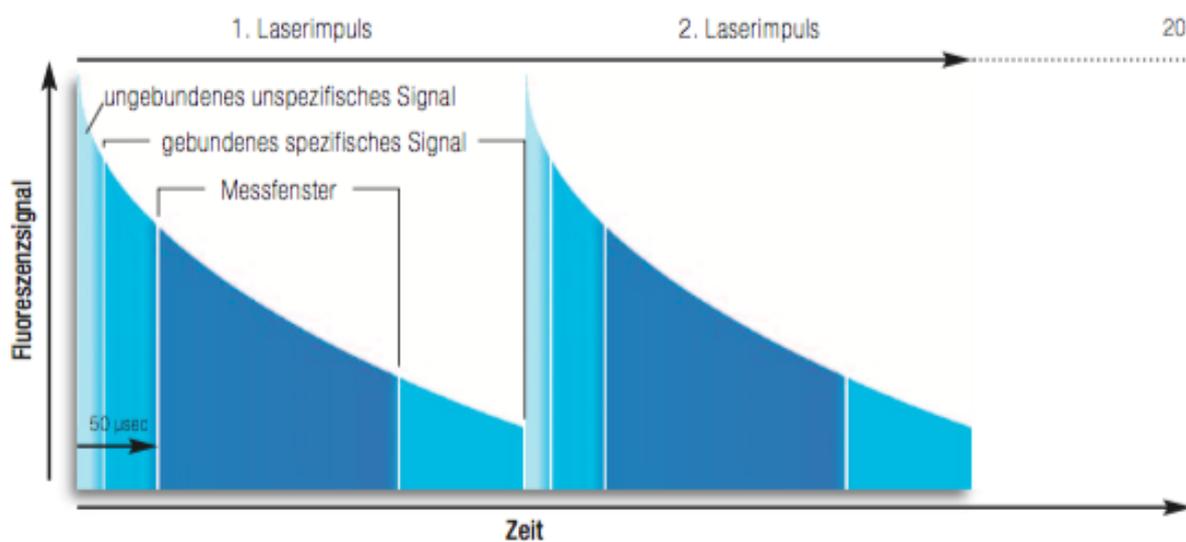


Abbildung 5 Ablauf einer Messung (256)

3.3.3 Technische Daten des BRAHMS KRYPTOR compact PLUS

Tabelle 10 Technische Daten des BRAHMS KRYPTOR compact PLUS (262)

Eigenschaft	Wert
Probenvolumen	14 µl
Probentyp	Serum/EDTA-Plasma
Inkubationszeit	29 min
Direkter Messbereich	11,8 - 3 000 ng/ml
Messbereich bei automatischer Verdünnung	11,8 - 1 000 000 ng/ml
Detektionslimit	11,8 ng/ml
Stabilität des Kits bei Verwendung	29 Tage
Kalibrator	1 Punkt
Kalibratorstabilität	15 Tage

3.4 Statistische Methoden

Die Daten wurden mithilfe von IBM SPSS Statistics 22.0v/23.0v (IBM Corporation; Armonk, USA), Microsoft Excel für Mac 2011 (Microsoft Corporation; Redmond, USA) und SAS Software Version 9.4 (SAS Institute Inc.; Cary, USA) analysiert. Dies erfolgte mit der dankenswerten Unterstützung von [REDACTED] des Instituts für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik der Universitätsmedizin Mainz. Die Verteilung quantitativer Variablen wird mithilfe von Mittelwerten (M) und Standardabweichungen (SD) oder bei schiefen Verteilungen mit Median und Perzentilen beschrieben. Der Boxplot dient der graphischen Darstellung der Mediane der logarithmierten CgA-Werte. Das Säulendiagramm sowie das Histogramm dienen der Veranschaulichung von Häufigkeitsverteilungen.

Die CgA-Werte wurden mit dem Logarithmus zur Basis 10 (Lg) transformiert, um die Normalverteilungsannahme zu gewährleisten. Im linearen Regressionsmodell wird der logarithmierte CgA-Wert als Zielvariable verwendet, im logistischen Regressionsmodell die binären CgA-Befunde. Bei binären Variablen gelten CgA-Werte ≥ 98 ng/ml als positiv.

Unterschiede zwischen kollektiv-spezifischen, adjustierten Mittelwerten mit 95%-KI ohne Multiplizitätsadjustierung werden mithilfe des Hsu's Mean-Mean Scatter Plots aufgezeigt (263). Auf ähnliche Weise werden Unterschiede im Anteil von CgA-positiven Patienten der Erkrankungsgruppen und der gesunden Kontrollgruppe (C)

dargestellt. Die Basis stellte ein lineares Regressionsmodells dar, das an die binäre Outcomevariable angepasst wurde.

Die *Receiver Operating Characteristic* (ROC)-Kurve wird herangezogen, um die Diskriminierungsfähigkeit von CgA zwischen gesunden Probanden und Patienten mit AG zu testen. Mithilfe des Spearman Rank Korrelationskoeffizienten wird die Beziehung zwischen CgA und Gastrin analysiert.

Zweiseitige p-Werte unter 0,05 gelten als statistisch signifikant. Ein Signifikanzniveau unter 0.001 wird als statistisch hochsignifikant gewertet.

NET-Patienten und C kommen aufgrund ihrer Rolle als Positiv- und Negativkontrollen nicht in allen statistischen Tests vor.

4. Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der mithilfe des Kryptors bestimmten Serumbloodproben beschrieben und die demographischen und serologischen Daten der Patientenakten ausgewertet. Dies geschieht mithilfe der in Abschnitt 3.4 erläuterten statistischen Verfahren.

4.1 Demographische Daten

Die Unterschiede und Gemeinsamkeiten der Kollektive hinsichtlich ihrer Demographie sind in Tabelle 11 dargestellt.

Das mediane Alter der Patienten bei der Blutentnahme schwankt in den meisten Kollektiven um die 45 Jahre. Die Kollektive der CD-Patienten (Median: 34 Jahre) und der Angehörigen (Median: 25 Jahre) sind hingegen 10-20 Jahre jünger, da sie entweder früher diagnostiziert wurden oder sich vorwiegend aus Kindern der Patienten zusammensetzen (Anzahl (N) Patienten < 18 Jahre in CD N = 26; in Angehörigen von Autoimmungastritis Patienten (Rel) N = 35). Im Gegensatz dazu repräsentieren Patienten mit AG und NET die älteren Kollektive mit einem medianen Altern von 53 Jahren und 60 Jahren.

Betrachtet man die Geschlechterverteilung, fällt auf, dass abgesehen vom NET-Kollektiv (weiblich: 40,6%) Frauen mit einem Anteil von 50% bis 80% dominieren.

77,3% der eingeschlossenen Probanden sind Nicht-Raucher, während 13,3% Raucher (HT: 15,3%; AG: 17%; GD: 21,3%; AP: 22,4%) und 9,4% abstinenten Raucher (HT: 16,9%; GD: 16,9%) identifiziert werden können.

Die PPI-Einnahme überwiegt in den folgenden vier Gruppen AG, AP, Patienten mit Schilddrüsenknoten (TN) und AD. Bei über 90% der Patienten anderer Kollektive hat keine Verordnung von PPI im Zeitraum um die Blutentnahme stattgefunden. Aufgrund dessen wird davon ausgegangen, dass es zu keiner regelmäßigen und vorgeschriebenen Einnahme bei diesen Patienten kam.

Der Nikotinkonsum sowie die Einnahme von PPI konnte in der gesunden Kontrollgruppe sowie bei NET-Patienten aufgrund mangelnder Angaben nicht erfasst werden. Der Gebrauch von PPI wird im gesunden Kontrollkollektiv als negativ erachtet (Tabelle 11).

Tabelle 11 Demographische Daten

Kollektiv	N	Geschlecht m / w (N)	Alter [Jahre] Median (25./75. Perzentile)	< 18 Jahre (N)	Nikotinkonsum Ja/ abstinent/ nein (%)	Einnahme PPI (%)
Endokrine Autoimmun- erkrankung	358	120/238	46,0 (37,0/ 54,0)	7	17,0/ 13,4/ 69,6	6,7
T1D	56	28/28	41,5 (26,3/ 52,8)	2	8,9/ 10,7/ 80,4	5,4
AP	98	35/63	48,0 (39,0/ 58,0)	2	22,4/ 12,2/ 65,3	9,2
GD	89	22/67	48,0 (39,0/ 51,5)	1	21,3/ 16,9/ 61,8	4,5
HT	85	22/63	42,0 (36,0/ 51,0)	1	15,3/ 12,9/ 71,8	3,5
AD	30	13/17	45,5 (41,8/ 61,8)	1	6,7/ 13,3/ 80,0	16,7
Nicht- endokrine Autoimmun- erkrankung	197	40/157	45,0 (29,0/ 56,0)	28	13,2/ 7,6/ 79,2	6,6
AG	112	23/89	53,0 (45,0/ 64,0)	2	17,0/ 8,9/ 74,1	8,9
CD	85	17/68	34,0 (14,0/ 44,0)	26	8,2/ 5,9/ 85,9	3,5
NET	32	19/13	60,0 (51,3/ 71,8)	0		
TN	82	24/58	44,5 (34,5/ 54,0)	0	4,9/ 2,4/ 92,7	11,0
Rel	89	43/46	25,0 (14,0/ 49,0)	35	11,2/ 6,7/ 82,0	3,4
C	49	13/36	39,0 (27,5/ 57,0)	4		
Total	807	259/548	45,0 (32,0/ 55,0)	74	13,9/ 9,8/ 76,3	6,7

AD = M. Addison, AG = Autoimmungastritis, AP = Autoimmun-Polyendokrinopathie, C = gesunde Kontrollgruppe, CD = Zöliakie, GD = M. Basedow, HT = Hashimoto Thyreoiditis, m = männlich, N = Anzahl, NET = Neuroendokriner Tumor, Rel = Angehörige von Autoimmungastritis Patienten, TN = Schilddrüsenknoten, T1D = Typ 1 Diabetes mellitus, w = weiblich, % = Prozent

4.1.1 Geschlechterverteilung

In der Geschlechterverteilung des Gesamtkollektivs überwiegt, wie bereits in den einzelnen Kollektiven, eindeutig der Frauenanteil. Frauen machen 68% der Probanden dieser Studie aus. Betrachtet man die Gesamtheit der Autoimmunerkrankungen liegt der Frauenanteil (71,2%) über dem Anteil des Gesamtkollektivs. Passend hierzu ist das weibliche Geschlecht in der Referenzgruppe (RG) mit 71,8% vertreten. Untergliedert man die Autoimmunität in gastrointestinal (AG, CD) und endokrin (T1D, AP, GD, HT, AD) wird sichtbar, dass der Frauenanteil der gastrointestinalen Autoimmunität jenen der endokrinen erneut mit 13 Prozentpunkten übersteigt (Abbildung 6).

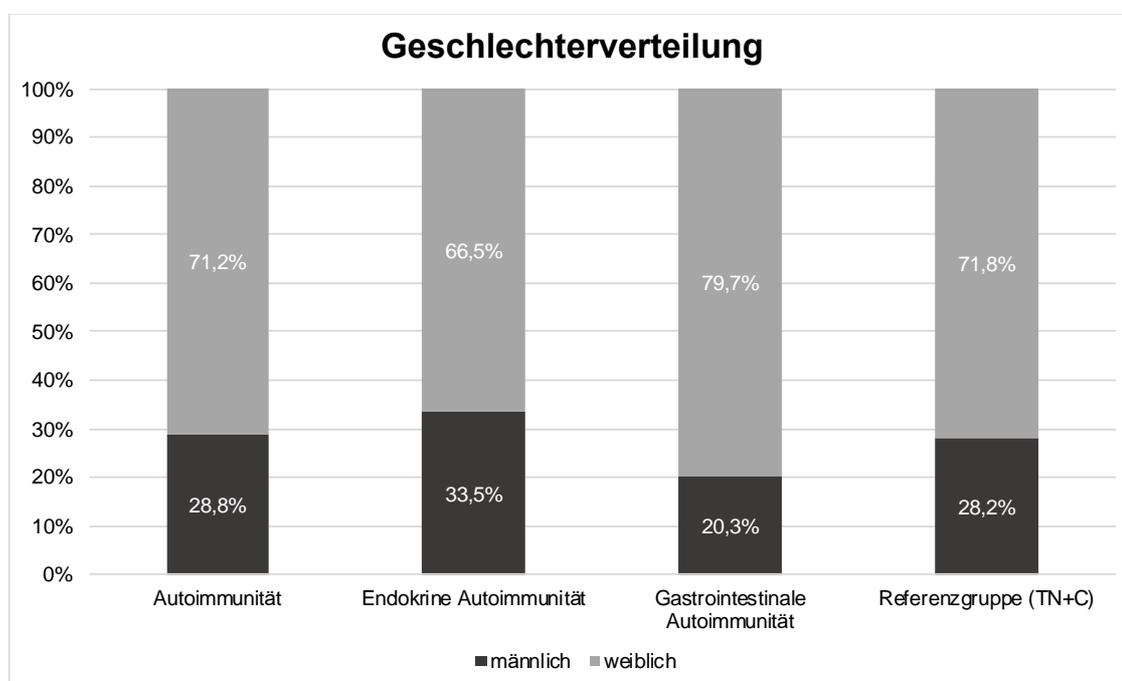


Abbildung 6 Säulendiagramm der Geschlechterverteilung in der Autoimmunität allgemein (N = 555), in endokriner (N = 358) und in gastrointestinaler (N = 197) Autoimmunität sowie in der Referenzgruppe

C = gesunde Kontrollgruppe, TN = Schilddrüsenknoten

4.1.2 Altersverteilung

Das Alter bei Abnahme ist über alle 11 Kollektive hinweg annähernd normalverteilt mit einem $M \pm SD$ von $43,6 \pm 17,4$ Jahren (Abbildung 7).

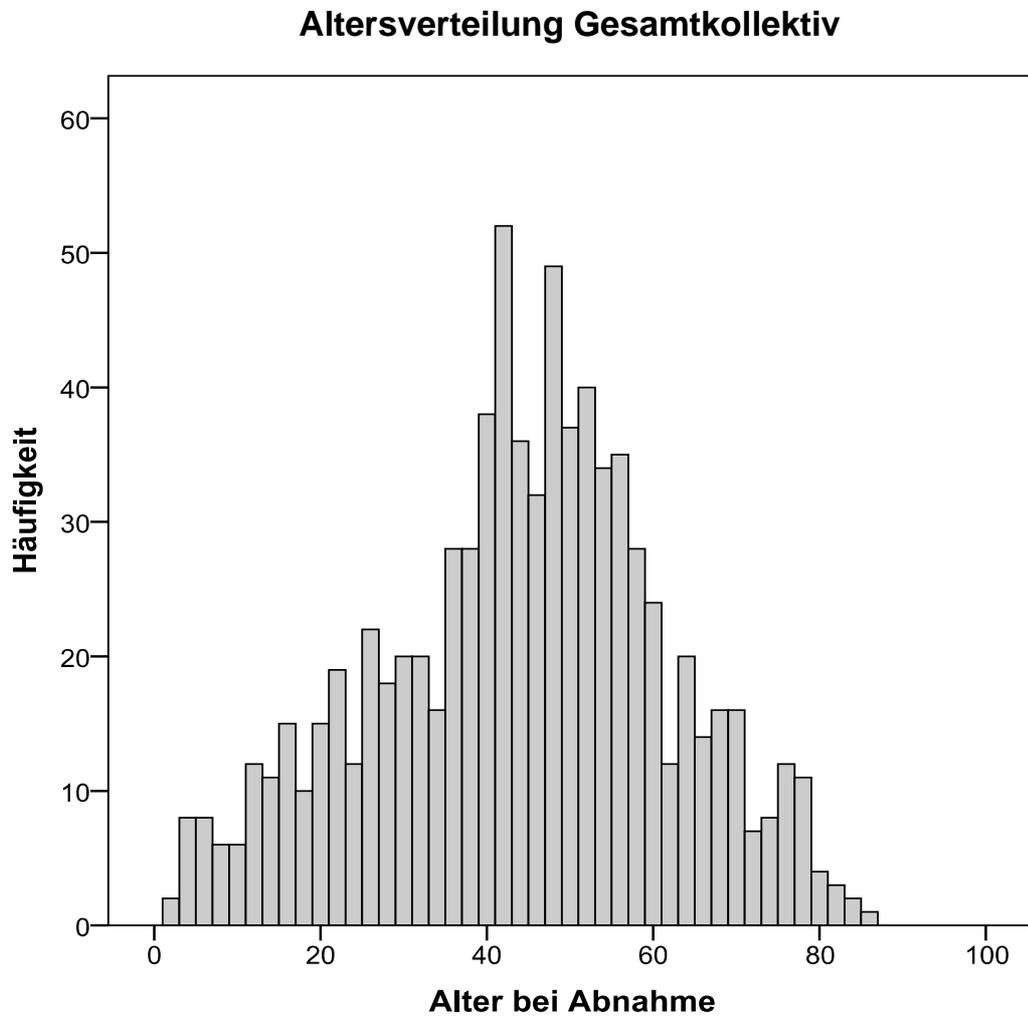


Abbildung 7 Histogramm der Altersverteilung des Gesamtkollektivs

Die folgenden Abbildungen zeigen, dass das Alter der RG ($M \pm SD$: $42,8 \pm 14,8$ Jahre), das Alter der Kollektive der endokrinen ($M \pm SD$: $45,6 \pm 14,1$ Jahre) und gastrointestinalen ($M \pm SD$: $43,2 \pm 19,5$ Jahre) Autoimmunität und das Alter der Gesamtgruppe Autoimmunität ($M \pm SD$: $44,8 \pm 16,3$ Jahre) aufeinander abgestimmt und annähernd normalverteilt sind (*Abbildung 8, Abbildung 9*). Auch die Subgruppen weisen annähernd normalverteilte Histogramme der Altersverteilung auf.

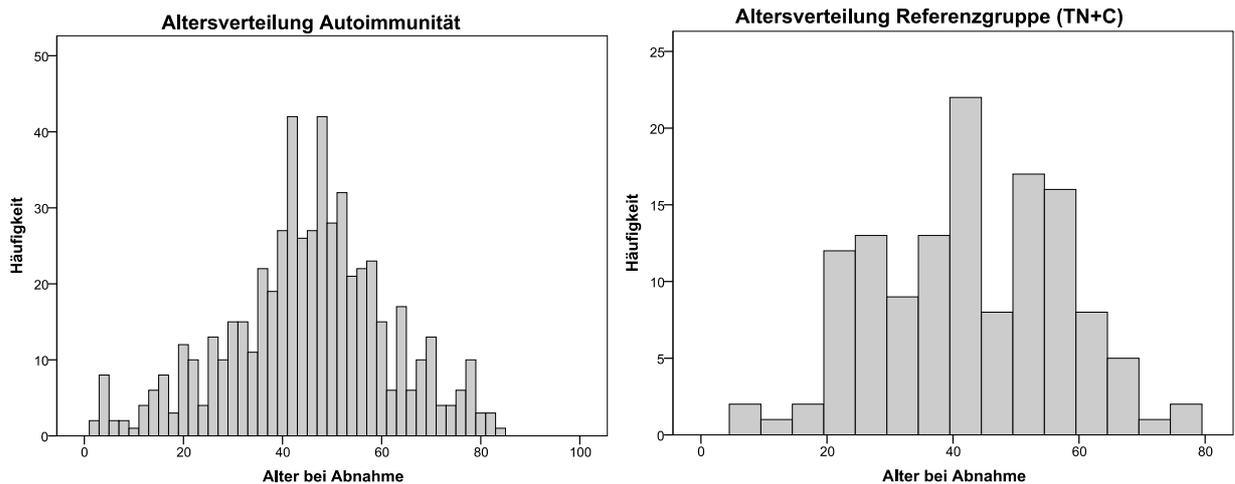


Abbildung 8 Histogramm der Altersverteilung der Autoimmunität allgemein (N = 555) und der Referenzgruppe (N = 131)

C = gesunde Kontrollgruppe, TN = Schilddrüsenknoten

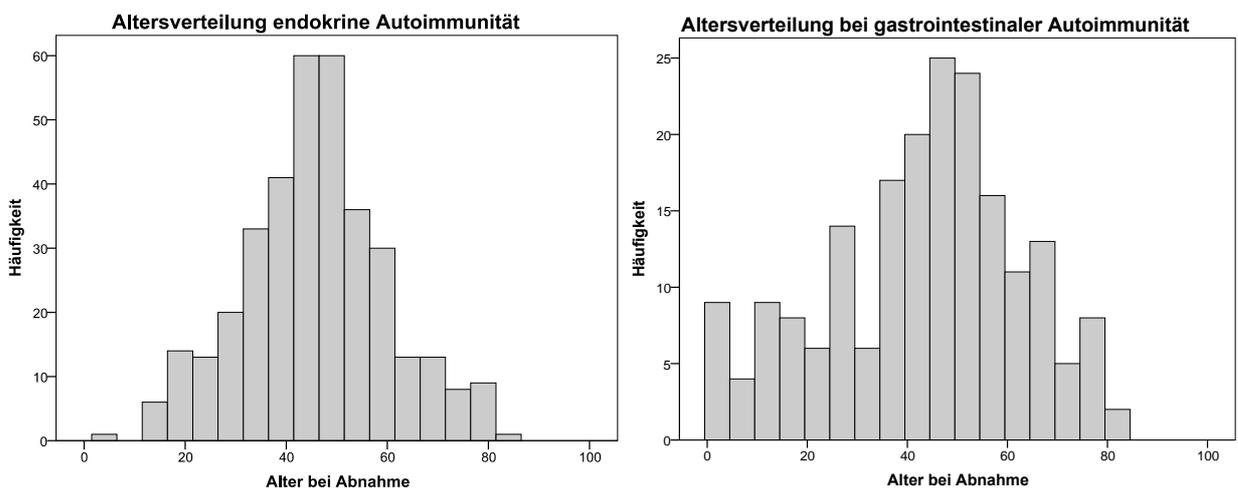


Abbildung 9 Histogramm der Altersverteilung der endokrinen (N = 358) und gastrointestinalen (N = 197) Autoimmunität

4.2 Serologische Daten: Chromogranin A

Tabelle 12 ermöglicht einen Vergleich der Mediane des LgCgA sowie dem Anteil an CgA-positiv getesteten Serumblutproben aufgeteilt nach Kollektiven.

Bei der folgenden Ergebnisdarstellung wird ein Cutoff-Level von 98 ng/ml für alle CgA-Serumspiegel verwendet, wobei Werte ≥ 98 ng/ml als positiv gelten (71). Ein abweichender Cut-Off-Wert für Kinder ist nicht gegeben.

Tabelle 12 Serologische Daten: Vergleich der Mediane und der 25./ 75. Perzentilen des dekadischen Logarithmus von Chromogranin A (ng/ml)

Kollektiv	N	CgA Positiv (%)	LgCgA [ng/ml] Median	LgCgA [ng/ml] 25./75. Perzentile
Endokrine Autoimmunerkrankung	358	20,4	1,66	1,47/ 1,88
T1D	56	39,3	1,84	1,62/ 2,21
AP	98	23,5	1,67	1,47/ 1,93
GD	89	19,1	1,69	1,53/ 1,87
HT	85	8,2	1,59	1,40/ 1,72
AD	30	13,3	1,60	1,41/ 1,76
Nicht-endokrine Autoimmunerkrankung	197	24,9	1,71	1,52/ 1,95
AG	112	38,4	1,79	1,58/ 2,09
CD	85	7,1	1,61	1,51/ 1,75
NET	32	65,6	2,19	1,76/ 2,59
TN	82	4,9	1,47	1,35/ 1,63
Rel	89	9	1,60	1,46/ 1,73
C	49	4,1	1,37	1,29/ 1,62
Total	807	19,5	1,63	1,46/ 1,85

AD = M. Addison, AG = Autoimmungastritis, AP = Autoimmun-Polyendokrinopathie, C = gesunde Kontrollgruppe, CD = Zöliakie, CgA = Chromogranin A, GD = M. Basedow, HT = Hashimoto Thyreoiditis, Lg = dekadischer Logarithmus, N = Anzahl, NET = Neuroendokriner Tumor, Rel = Angehörige von Autoimmungastritis Patienten, TN = Schilddrüsenknoten, T1D = Typ 1 Diabetes mellitus, % = Prozent,

Neben dem bereits bekannten hohen Anteil von CgA-Positiven bei NET-Patienten (65,6%), findet man die meisten CgA-positiven Probanden im T1D-Kollektiven und AG-Kollektiv mit 39,3% und 38,4%. C und TN repräsentieren die geringste Prävalenz an CgA-positiven Probanden (4,1% und 4,9%) (Abbildung 10).

Vergleicht man alle Kollektive, so kann man in den Kollektiven mit Autoimmunerkrankungen einen höheren Anteil an CgA-positiven Patienten feststellen als in den Kollektiven ohne Autoimmunerkrankungen (ausgenommen NET) (Abbildung 10).

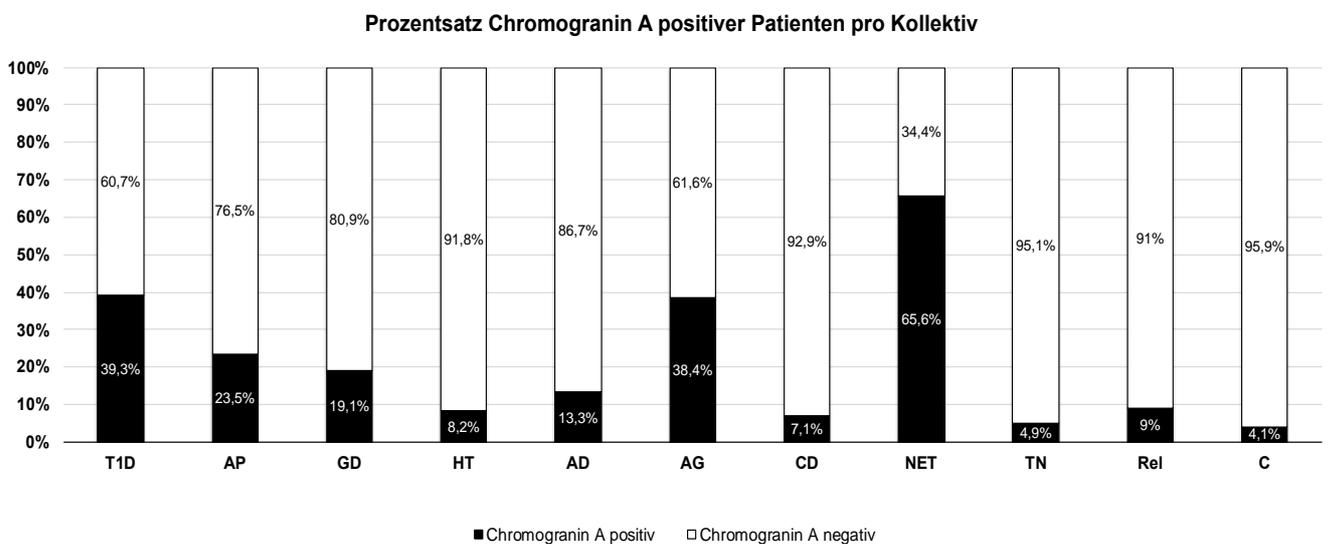


Abbildung 10 Säulendiagramm der binären Chromogranin A-Verteilung sortiert nach Kollektiven

AD = M. Addison, AG = Autoimmungastritis, AP = Autoimmun-Polyendokrinopathie, C = gesunde Kontrollgruppe, CD = Zöliakie, GD = M. Basedow, HT = Hashimoto Thyreoiditis, NET = Neuroendokriner Tumor, Rel = Angehörige von Autoimmungastritis Patienten, TN = Schilddrüsenknoten, T1D = Typ 1 Diabetes mellitus

Zur Veranschaulichung der logarithmierten CgA-Mediane und deren dazugehörigen Perzentilen dient das Boxplot in Abbildung 11.

Insgesamt liegt der Median von CgA bei 42,66 ng/ml. Die einzelnen Mediane aller Kollektive übersteigen den Median des gesunden Kontrollkollektives. NET, T1D und Patienten mit AG weisen mit Medianen von 154,88 ng/ml, 69,18 ng/ml und 61,66 ng/ml die höchsten Mediane der CgA-Werte auf. Dies steht in Übereinstimmung mit den oben genannten Ergebnissen zum Anteil an CgA-Positiven in den entsprechenden Gruppen (Abbildung 10). Der Anteil an CgA-positiven CD-Patienten (7,1%) ist ähnlich zum Anteil in der gesunden Kontrollgruppe (4,1%), allerdings unterscheiden sich die Median-Werte der beiden Kollektive deutlich (Median CD: 40,74 ng/ml; Median C: 23,44 ng/ml) (Abbildung 10, Abbildung 11).

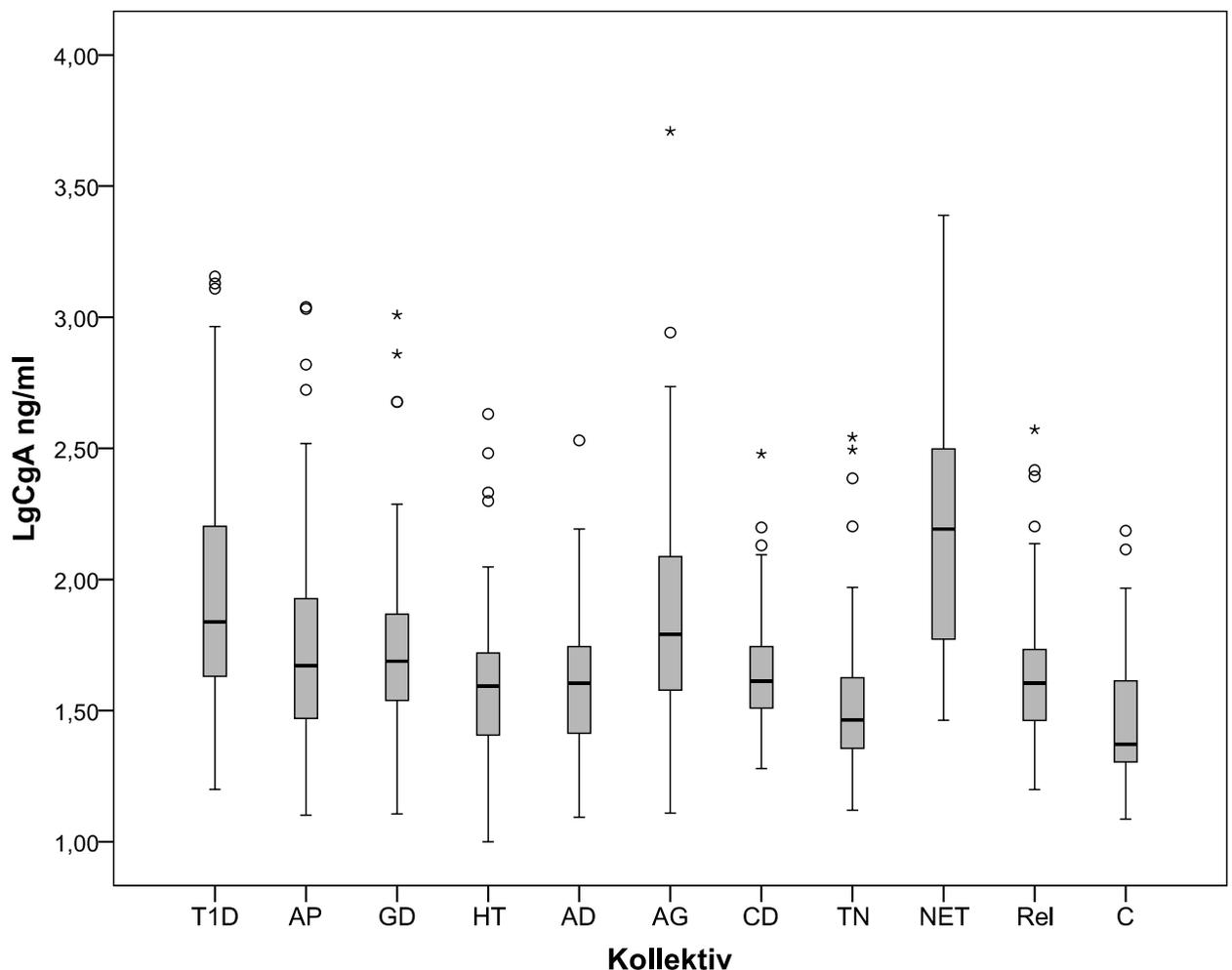


Abbildung 11 Boxplot des dekadischen Logarithmus der Chromogranin A-Serumspiegel der verschiedenen Kollektive

* und ° repräsentieren die Ausreißer, während die Whiskers maximal auf das 1,5-fache des Interquartilabstandes verlängert sind.

AD = M. Addison, AG = Autoimmungastritis, AP = Autoimmun-Polyendokrinopathie, C = gesunde Kontrollgruppe, CD = Zöliakie, CgA = Chromogranin A, GD = M. Basedow, HT = Hashimoto Thyreoiditis, Lg = dekadischer Logarithmus, NET = Neuroendokriner Tumor, Rel = Angehörige von Autoimmungastritis Patienten, TN = Schilddrüsenknoten, T1D = Typ 1 Diabetes mellitus

4.3 Regressionsmodelle

Im Folgenden wird mithilfe logistischer und linearer Regressionsmodelle der Einfluss folgender Faktoren (Erkrankungen, Geschlecht, Alter, Nikotinkonsum und PPI-Einnahme) auf die CgA-Positivität sowie auf den LgCgA-Serumspiegel getestet.

4.3.1 Logistisches Regressionsmodell

Zur Untersuchung der binären Zielgröße von CgA eignet sich das logistische Regressionsmodell. In die Analyse gehen die Informationen aller 807 Probanden ein. Der Einfluss des Kollektivs, des Geschlechts, des Alters pro Jahr und der PPI-Einnahme auf die Positivität von CgA wird mithilfe der Odds Ratio (OR) dargestellt. Um ein leistungsfähigeres Referenzkollektiv zu erhalten, wurden die Kollektive C und TN zusammengelegt.

Das logistische Regressionsmodell verwirft die Hypothese der Gleichheit der Kollektive ($p < 0,0001$). Die Chance einer positiven CgA-Messung war in AG 7,82-mal so hoch, in T1D 15,91-mal so hoch und in NET 27,44-mal so hoch wie im Referenzkollektiv (C+TN). Das Geschlecht zeigt keinen signifikanten Einfluss auf CgA. Der Effekt der PPI-Einnahme kann hingegen bekräftigt werden ($p < 0,0001$). Ferner zeigt sich ein hochsignifikanter, wenn auch geringer Einfluss des Alters pro Jahr auf die CgA-Positivität (*Tabelle 13*).

Tabelle 13 Multivariable logistische Regression der Positivität von Chromogranin A

Einflussfaktor	Odds Ratio	95%-KI	P-Wert
Erkrankung			< 0,0001
Endokrine Autoimmunerkrankung			
T1D	15,91	5,73 - 44,16	< 0,0001
AP	4,29	1,62 - 11,39	0,003
GD	4,06	1,50 - 11,00	0,006
HT	1,56	0,49 - 4,95	0,45
AD	1,22	0,27 - 5,56	0,80
Nicht-endokrine Autoimmunerkrankung			
AG	7,82	3,10 - 19,73	< 0,0001
CD	1,93	0,58 - 6,45	0,28
NET	27,44	8,83 - 85,34	< 0,0001
Rel	2,33	0,74 - 7,35	0,15
<i>TN & C Referenz</i>	1	-	-
Alter (pro Jahr)	1,04	1,03 - 1,05	< 0,0001
PPI-Einnahme	8,53	3,98 - 18,29	< 0,0001
<i>PPI negativ Referenz</i>	1	-	-
Geschlecht (männlich vs. weiblich)	0,68	0,43 - 1,09	0,11

AD = M. Addison, AG = Autoimmungastritis, AP = Autoimmun-Polyendokrinopathie, C = gesunde Kontrollgruppe, CD = Zöliakie, GD = M. Basedow, HT = Hashimoto Thyreoiditis, KI = Konfidenzintervall, NET = Neuroendokriner Tumor, PPI = Protonenpumpeninhibitor, Rel = Angehörige von Autoimmungastritis Patienten, TN = Schilddrüsenknoten, T1D = Typ 1 Diabetes mellitus, vs. = versus

Abbildung 12 ermöglicht einen Vergleich der relativen Häufigkeiten positiver CgA-Befunde pro Kollektiv und wurde hinsichtlich Alter, Geschlecht und PPI-Einnahme adjustiert.

Es wird sichtbar, dass sich die binären CgA-Werte der NET-Patienten signifikant von allen anderen Kollektiven unterscheiden. Die CgA-Positivität von T1D und AG kann hingegen nicht voneinander differenziert werden kann. Sie unterscheidet sich jedoch signifikant von allen weiteren Subgruppen. Bei den verbleibenden Gruppen sind nur noch vereinzelt signifikante Unterschiede auf einem lokalen Niveau von 0,05 erkennbar.

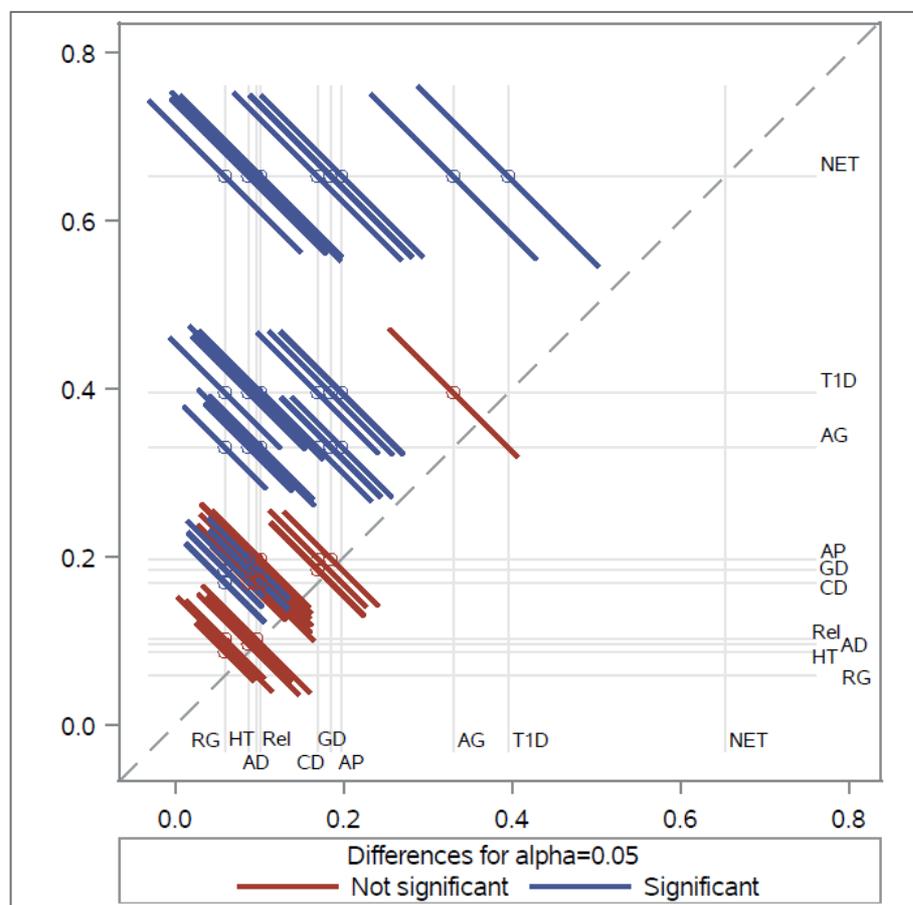


Abbildung 12 Graphische Darstellung der paarweisen Vergleiche aller Kollektive bezüglich des binären Outcomes von Chromogranin A

Die Skalen beschreiben den Anteil Chromogranin A-positiver Patienten. Die grauen horizontalen und vertikalen Linien kennzeichnen die adjustierten Mittelwerte. Die farbigen Linien repräsentieren das 95%-Konfidenzintervall der Unterschiede. Konfidenzintervalle, welche nicht die Diagonale kreuzen, sind blau markiert und stellen signifikante Unterschiede bei einem lokalen Niveau von 0,05 dar.

AD = M. Addison, AG = Autoimmungastritis, AP = Autoimmun-Polyendokrinopathie, CD = Zöliakie, GD = M. Basedow, HT = Hashimoto Thyreoiditis, NET = Neuroendokriner Tumor, Rel = Angehörige von Autoimmungastritis Patienten, RG = Referenzgruppe (C + TN), T1D = Typ 1 Diabetes mellitus, *Differences for alpha* = Unterschied für Alpha, *not significant* = nicht signifikant, *significant* = signifikant

4.3.2 Lineares Regressionsmodell

Das lineare Regressionsmodell (*Tabelle 14*) wurde mit dem LgCgA als Zielgröße und den Kollektiven, dem Alter pro Jahr, dem Geschlecht, dem Nikotinkonsum und der PPI-Einnahme als Einflussgrößen erstellt. 785 CgA-Serumspiegel innerhalb der Detektionsgrenzen werden verwendet. Unter den 22 fehlenden kontinuierlich skalierten Werte sind im Binärsystem 15 CgA-negativ und 7 CgA-positiv. Die Effekte werden als Geometrisches Mittelwertverhältnis (GMR) erfasst, welches die Zehnerpotenz des Regressionskoeffizienten darstellt. Der Regressionskoeffizient berechnet sich wiederum aus der Mittelwertsdifferenz der logarithmierten CgA-Werte jedes Einflussfaktors und seiner Referenz. Um die Präzision der Vergleiche mit dem Referenzkollektiv zu verbessern, wurden die Kollektive C und TN zusammengelegt. Als die Kollektive mit den höchsten GMR zeichnen sich NET, T1D und AG mit 4,07, 2,69 und 1,95 (jeweils $p < 0,0001$) aus und gleichen somit jenen mit den höchsten OR. Wie bereits bei der logistischen Regression ergibt sich kein signifikanter Einfluss des Geschlechts auf die CgA-Serumspiegel. Die Bedeutung der PPI-Einnahme sowie des Alters pro Jahr kann jedoch auch im linearen Regressionsmodell bestätigt werden (jeweils $p < 0,0001$) (*Tabelle 14*).

Eine ähnliches lineares Regressionsmodell mit 740 verwendeten Beobachtungen (exklusiv der C) zeigt, dass ein aktiver Nikotinkonsum die gemessenen CgA-Spiegel signifikant beeinflusst ($p = 0,02$). Abstinente Raucher unterscheiden sich hingegen nicht von Nichtrauchern ($p = 0,61$) (*Tabelle 14*).

Tabelle 14 Multivariable lineare Regression des dekadischen Logarithmus von Chromogranin A

Einflussfaktor	Geometrisches Mittelwertverhältnis	95%-KI	P-Wert
Erkrankung			< 0,0001
Endokrine Autoimmunerkrankung			
T1D	2,69	2,14 - 3,47	< 0,0001
AP	1,51	1,23 - 1,86	< 0,0001
GD	1,62	1,32 - 2,00	< 0,0001
HT	1,17	1,05 - 1,45	0,15
AD	1,07	0,78 - 1,45	0,70
Nicht-endokrine Autoimmunerkrankung			
AG	1,95	1,58 - 2,34	< 0,0001
CD	1,55	1,26 - 1,95	< 0,0001
NET	4,07	2,95 - 5,75	< 0,0001
Rel	1,45	1,17 - 1,82	< 0,001
<i>TN & C Referenz</i>			
Alter (pro Jahr)	1,01	1,006 - 1,013	< 0,0001
PPI-Einnahme	2,32	1,81 - 2,98	< 0,0001
<i>PPI negativ Referenz</i>			
Geschlecht (männlich vs. weiblich)	0,98	0,86 - 1,10	0,61
Nikotinkonsum			
Ja*	1,21	1,03 - 1,43	0,02
Abstinent*	0,95	0,78 - 1,15	0,61
<i>Nein* (Referenz)</i>			

* 740 Untersuchungen wurden zur Analyse der Bedeutung des Nikotinkonsums für Chromogranin A verwendet (exklusiv der gesunden Kontrollgruppe).

AD = M. Addison, AG = Autoimmungastritis, AP = Autoimmun-Polyendokrinopathie, C = gesunde Kontrollgruppe, CD = Zöliakie, GD = M. Basedow, HT = Hashimoto Thyreoiditis, KI = Konfidenzintervall, NET = Neuroendokriner Tumor, PPI = Protonenpumpeninhibitor, Rel = Angehörige von Autoimmungastritis Patienten, TN = Schilddrüsenknoten, T1D = Typ 1 Diabetes mellitus, vs. = versus

Die graphische Darstellung (*Abbildung 13*) der paarweisen Vergleiche aller Kollektive bezüglich des LgCgA wurde mithilfe der linearen Regression erstellt, die nach Geschlecht, Alter pro Jahr und PPI-Einnahme adjustiert wurde. 785 Untersuchungen innerhalb der Detektionsgrenzen wurden verwendet.

Eine klare Abgrenzung des NET-Kollektives und des T1D-Kollektives wird deutlich. Alle anderen Gruppen, inklusive AG, haben mehr als ein Kollektiv, von dem sie nicht signifikant unterschieden werden können. So kann bspw. das LgCgA-Level der Patienten mit AG nicht signifikant von jenem mit GD differenziert werden.

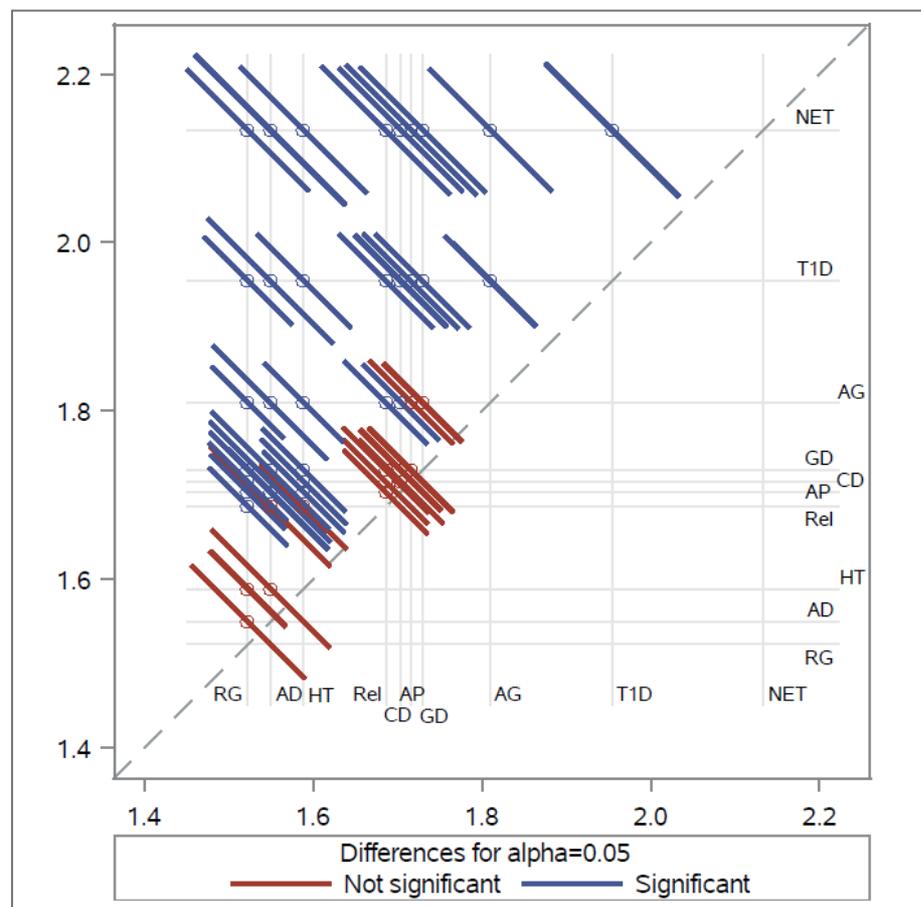


Abbildung 13 Graphische Darstellung der paarweisen Vergleiche der Unterschiede aller Kollektive bezüglich des dekadischen Logarithmus von Chromogranin A

Die Skalen beschreiben den erwarteten dekadischen Logarithmus des Chromogranin A-Wertes in ng/ml in allen Subgruppen.

AD = M. Addison, AG = Autoimmungastritis, AP = Autoimmun-Polyendokrinopathie, CD = Zöliakie, GD = M. Basedow, HT = Hashimoto Thyreoiditis, NET = Neuroendokriner Tumor, Rel = Angehörige von Autoimmungastritis Patienten, RG = Referenzgruppe (C + TN), T1D = Typ 1 Diabetes mellitus, *Differences for alpha* = Unterschied für Alpha, *not significant* = nicht signifikant, *significant* = signifikant

4.4 Gastrin, Parietalzell-Antikörper und Intrinsic Faktor-Antikörper

Im Folgenden werden die Parameter Gastrin, PCA und IFA, welche in der herkömmlichen serologischen Diagnostik der AG verwendet werden, im AG-Kollektiv näher betrachtet.

Der Median von Gastrin im AG-Kollektiv liegt mit 134,9 pg/ml deutlich oberhalb des Referenzbereiches von 13-115 pg/ml.

Der für AG spezifische PCA ist in 81,1% der Patienten nachweisbar. Deutlich seltener, aber dennoch mit 24,3% ist der IFA in Patienten mit AG nachweisbar (*Tabelle 15*).

Tabelle 15 Dekadischer Logarithmus von Gastrin und Prozentsatz der PCA-Positiven und IFA-Positiven im Autoimmungastritis-Kollektiv

Kollektiv	LgGastrin [pg/ml] Median	LgGastrin [pg/ml] 25./75. Perzentile	PCA Positiv (%)	IFA Positiv (%)
AG	2,13	1,49/ 2,78	81,1	24,3

AG = Autoimmungastritis, IFA = Intrinsic Faktor-Antikörper, Lg = dekadischer Logarithmus, PCA = Parietalzell-Antikörper, % = Prozent

4.4.1 Korrelation der Chromogranin A- und Gastrin-Konzentrationen

Die Korrelation der logarithmierten Konzentrationen von CgA und Gastrin im AG-Kollektiv ergibt einen hochsignifikanten linearen Zusammenhang, welcher auch im Streudiagramm sichtbar wird (*Abbildung 14*).

Der Spearman-Korrelationskoeffizient beträgt 0,552 (*Tabelle 16*).

Tabelle 16 Spearman-Korrelationskoeffizient des dekadischen Logarithmus von Chromogranin A und des dekadischen Logarithmus von Gastrin im Autoimmungastritis-Kollektiv

Spearman-Rho	Korrelationskoeffizient	Signifikant (2-seitig)
LgCgA x LgGastrin	0,552	< 0,001

CgA = Chromogranin A, Lg = dekadischer Logarithmus

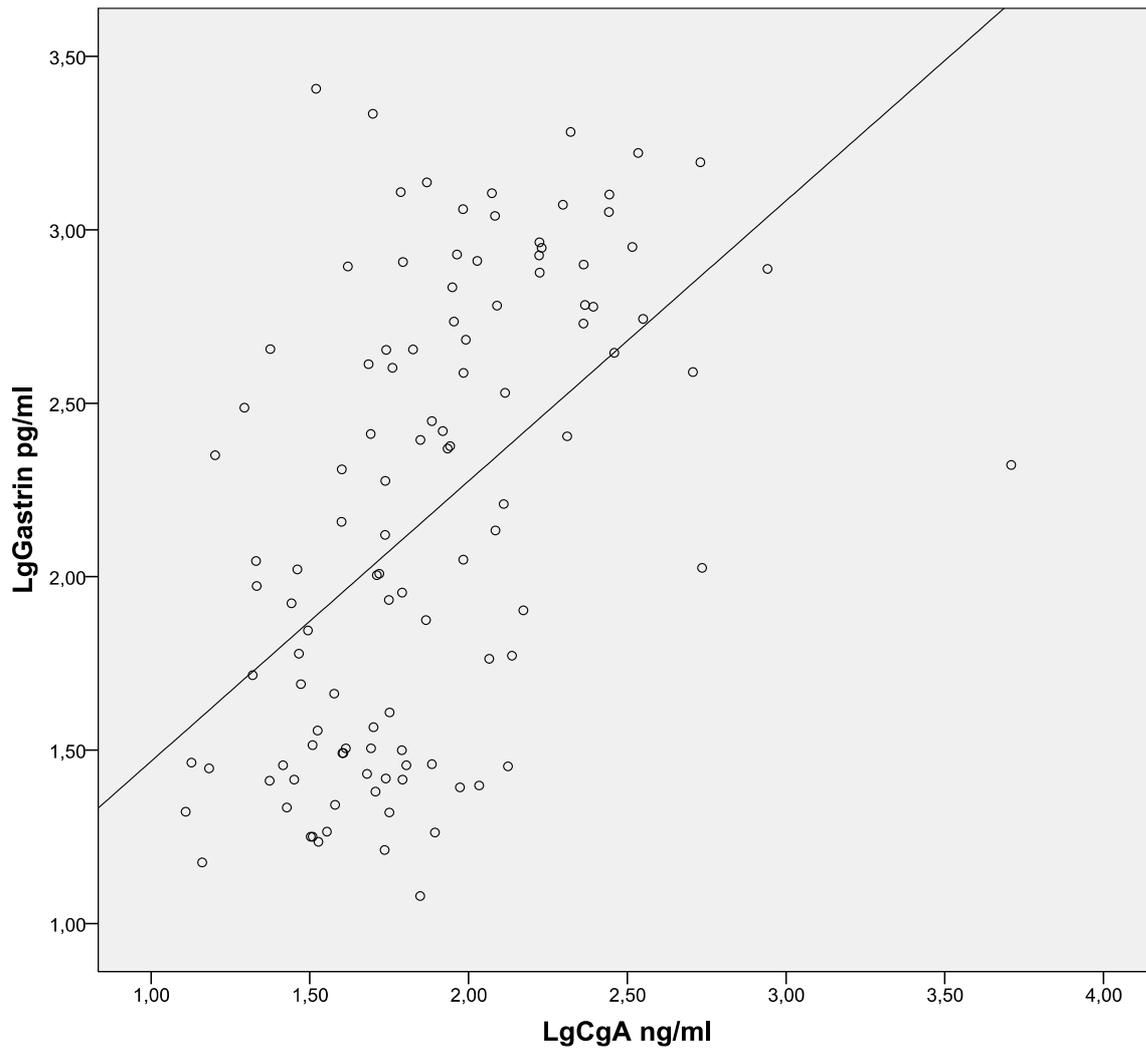


Abbildung 14 Korrelation der dekadischen Logarithmen der Chromogranin A- (ng/ml) und der Gastrin-Serumspiegel (pg/ml) im Autoimmungastritis-Kollektiv

CgA = Chromogranin A, Lg = dekadischer Logarithmus,

4.5 Receiver Operating Characteristic

Das im Folgenden verwendete statistische Verfahren ROC dient der Beurteilung der diagnostischen Wertigkeit von CgA als serologischer Marker für AG. Das Verfahren ermöglicht, mithilfe der Fläche unter der ROC-Kurve (= *Area under the Curve* (AUC)), den direkten Vergleich von CgA mit den konventionellen Biomarkern PCA und IFA (*Abbildung 15, Abbildung 16*). Da die IFA- und PCA-Befunde nur qualitativ vorlagen, werden hier die dichotomisierten Marker mithilfe der Daten von 111 AG-Patienten und 49 C-Probanden untersucht. Grenzwertige PCA-Werte wurden als positiv definiert, während grenzwertige IFA-Werte zum Ausgleich als negativ eingestuft wurden.

ROC-Kurven werden üblicherweise zur Beschreibung der Trennkraft kontinuierlich skalierten Merkmale verwendet, können aber auch bei binären Merkmalen eingesetzt werden. Hierbei ergibt sich ein aus der Sensitivität und Spezifität definierter eindeutiger Punkt, welcher zum Erhalt der ROC-Kurve mit den zwei Wertepaaren (Sensitivität = 0, Spezifität = 1 und Sensitivität = 1, Spezifität = 0) verbunden wird. Dies folgt dem Ansatz entweder alle Befunde als Krankheitshinweis oder als Hinweis auf Nicht-Krankheit zu werten. Das optimale Diagnoseverfahren (maximale Sensitivität und Spezifität) ist bei Werten in der linken oberen Ecke sowie einer AUC von eins gegeben. Bei Parametern mit Werten auf der Diagonalen kann kein Unterschied zwischen Krankheit und Nicht-Krankheit festgestellt werden (264).

4.5.1 Vergleich der ROC-Kurven einzelner Parameter (CgA, PCA und IFA)

Die ROC-Kurve bestätigt, mit einer AUC von 0,84 und einer sichtbar hohen Sensitivität und Spezifität, die Wertigkeit des aktuell für AG verwendeten Biomarkers PCA. Die AUC von PCA und CgA ($p < 0,0001$), von PCA und IFA ($p < 0,0001$), sowie von CgA und IFA ($p = 0,045$) unterscheiden sich signifikant voneinander (Abbildung 15).

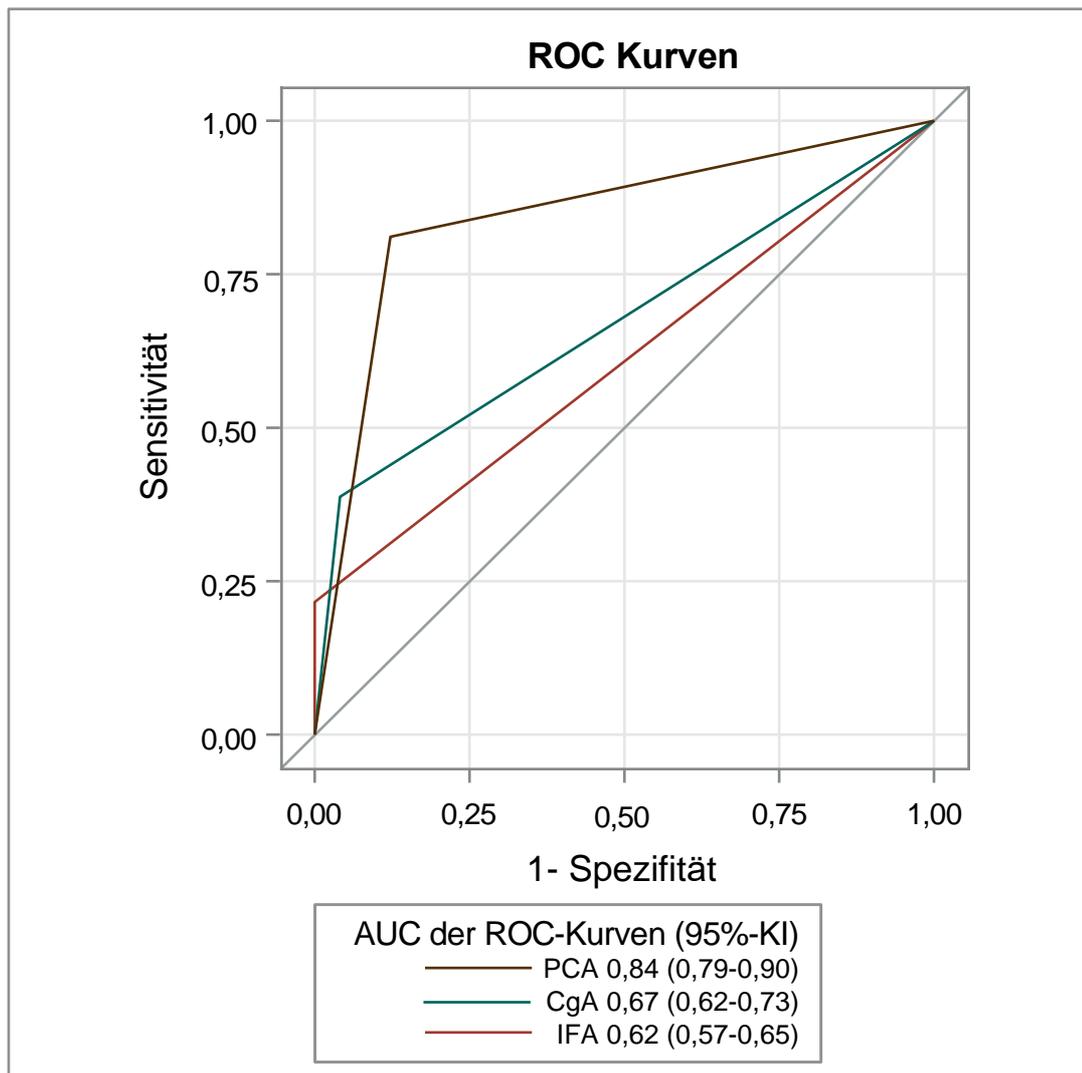


Abbildung 15 Receiver Operating Characteristic-Kurven von Chromogranin A, Parietalzell- und Intrinsic Faktor-Antikörper zur Differenzierung zwischen Patienten mit Autoimmungastritis und der gesunden Kontrollgruppe.

Die Zahlen repräsentieren die Fläche unter der Kurve und das 95%-Konfidenzintervall.

AUC = Area under the curve (= Fläche unter der Kurve), CgA = Chromogranin A, IFA = Intrinsic Faktor-Antikörper, KI = Konfidenzintervall, PCA = Parietalzell-Antikörper, ROC = Receiver Operating Characteristic

4.5.3 Vergleich der ROC-Kurven aus Kombinationen der Parameter

Die nachfolgende Analyse (Abbildung 16) zeigt, dass die AUC der Kombinationen von PCA+IFA und PCA+CgA jeweils signifikant größer sind als die AUC von PCA alleine ($p = 0,0013$ und $p = 0,0028$). Die größte Fläche unter der ROC-Kurve ergibt sich jedoch aus der Verbindung der drei Marker (PCA+IFA+CgA) und ist signifikant größer als die Kombination aus PCA+IFA ($p = 0,011$).

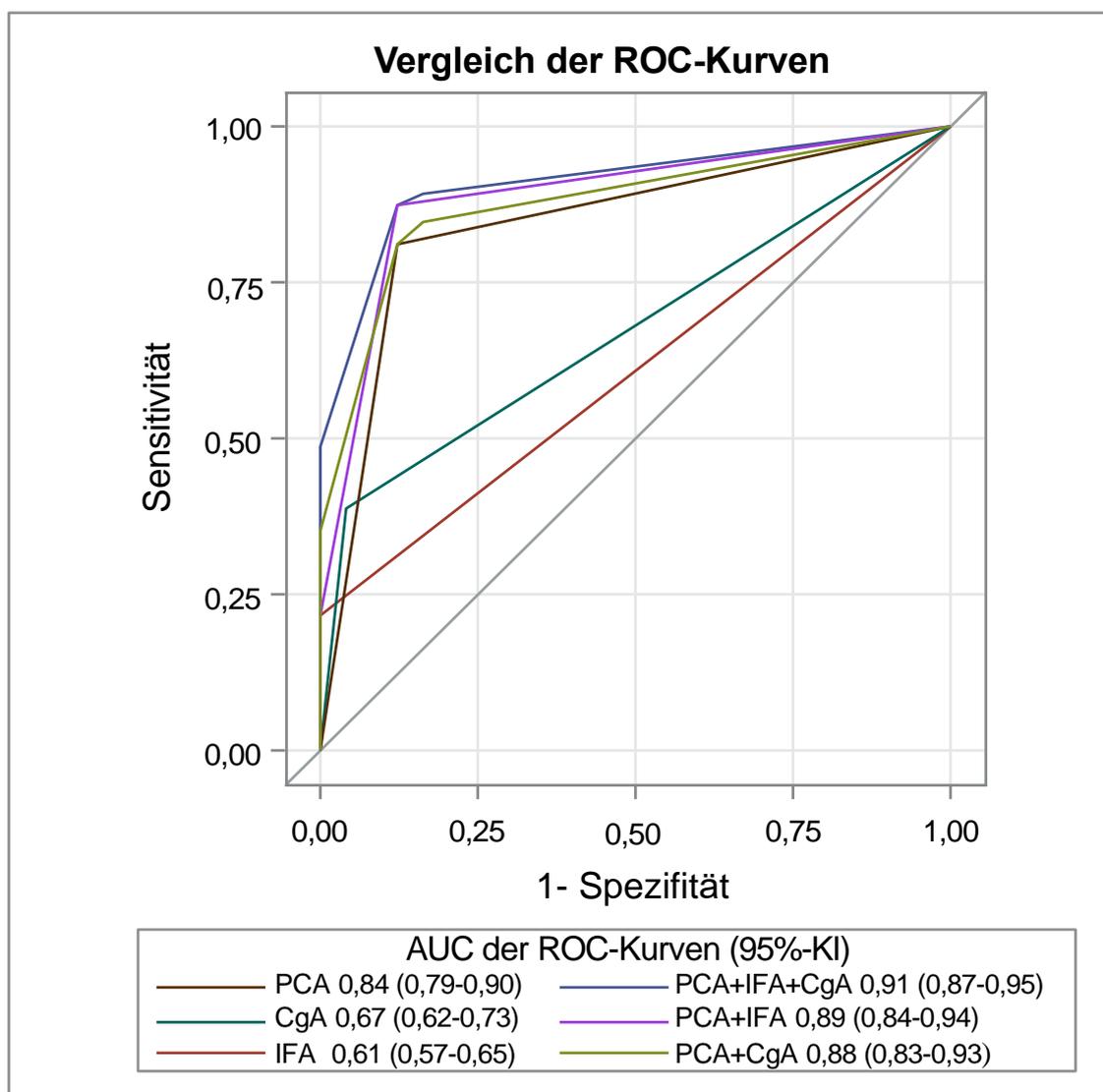


Abbildung 16 Receiver Operating Characteristic-Kurven von Chromogranin A, Parietalzell- und Intrinsic Faktor-Antikörper und deren Kombinationen zur Differenzierung zwischen Patienten mit Autoimmungastritis und der gesunden Kontrollgruppe.

Die Zahlen repräsentieren die Flächen unter der Kurve und das 95%-Konfidenzintervall. Die Kombinationen der Parameter sind lineare Scores basierend auf angepassten logistischen, binären Modellen jedes Markers zur Gewinnung aussagekräftiger Variablen.

AUC = Area under the curve (= Fläche unter der Kurve), CgA = Chromogranin A, IFA = Intrinsic Faktor-Antikörper, KI = Konfidenzintervall, PCA = Parietalzell-Antikörper, ROC = Receiver Operating Characteristic

Die mithilfe eines weiteren logistischen Modells berechneten OR (Tabelle 17) ermöglichen eine Aussage über die Vorhersagekraft eines der drei Parameter (CgA, PCA, IFA) für AG unter der Bedingung, dass die anderen beiden Parameter bereits bekannt sind.

Die Einbeziehung des CgA-Wertes erhöht die Vorhersagekraft für AG, da sich die Quote für AG bei bereits positivem PCA und IFA durch einen positiven CgA-Wert signifikant um den Faktor 6,5 erhöht ($p = 0,031$).

Tabelle 17 Multivariablen logistisches Modell zur Diskriminierung zwischen der Autoimmungastritis und der gesunden Kontrollgruppe

Marker	Odds Ratio (95%-KI)	P-Wert
CgA positiv	6,5 (1,4 - 47,9)	0,031
PCA positiv oder grenzwertig	29,1 (10,9 - 90,6)	< 0,0001
IFA positiv	∞ (8,5 - ∞)	n.d

CgA = Chromogranin A, IFA = Intrinsic Faktor-Antikörper, KI = Konfidenzintervall, n.d = nicht definiert, PCA = Parietalzell-Antikörper, % = Prozent

5. Diskussion

Der folgende Abschnitt dient dem Vergleich der zuvor beschriebenen Ergebnisse unserer Studie mit den bereits aus der Literatur vorhandenen Erkenntnissen.

Dies ist die erste Studie, die die CgA-Serumspiegel innerhalb eines großen Kollektivs (807 Probanden) mit endokrinen und nicht-endokrinen Autoimmunerkrankungen untersucht und zeigt, dass CgA in diversen Autoimmunitäten erhöht messbar ist.

5.1 Autoimmunität und Chromogranin A

Neuroendokriner Tumor und Chromogranin A

Vergleicht man die Ergebnisse unserer CgA-Messungen, so sind diese im Einklang mit den Ergebnissen bisheriger Studien, die signifikant höhere CgA-Werte in NET-Patienten als in Kontrollen feststellen (69, 97, 229). Der Anteil der gemessenen CgA-Werte über dem Grenzwert schwankt in den Studien zwischen 56,3% (97) und 92% (229), sodass der in unserer Arbeit erfasste Prozentsatz von 65,5% repräsentabel ist. Das Spektrum lässt sich durch die unterschiedliche Zusammensetzung der verwendeten NET-Kollektive erklären. Die Tumorzellart, die Differenzierung sowie die sekretorische Aktivität haben einen Einfluss auf die CgA-Werte (2, 3, 67, 84). Zudem unterscheidet sich, wie in einer vorherigen Studie (69), unser NET-Kollektiv signifikant ($p < 0,0001$) von der RG bestehend aus TN+C (*Tabelle 13, Tabelle 14*). Das mediane Alter der eingeschlossenen Patienten beträgt 60 Jahre, dies entspricht dem medianen Alter der Erstdiagnose (59 Jahre) (75). Somit eignet sich unsere NET-Gruppe gut als repräsentative Positivkontrolle.

Autoimmungastritis und Chromogranin A

AG ist eine weltweit unterdiagnostizierte Erkrankung (107). Die exakte Anzahl erkrankter Patienten bleibt aufgrund des langanhaltenden asymptomatischen klinischen Verlaufs und dem Mangel an umfangreicher Ursachenklärung einer Anämie unklar. Zur komplexen multidimensionalen Diagnose bedarf es sowohl einer Biopsie mit histopathologischer Beurteilung als auch einer Serologie mit Bestimmung der Auto-AK PCA und IFA (106, 107, 195). Unsere Studie testet beispielhaft anhand des AG-Kollektivs, inwieweit CgA ein potentieller Serummarker in der Diagnostik der AG ist. Der bekannte Pathomechanismus der CgA-Erhöhung bei AG ist ein Vorteil dieses Kollektivs. Die CgA-Konzentration korreliert bei AG signifikant mit der ECL-Zellmasse (62, 63, 69) und spiegelt in der Frühphase der Erkrankung die Hypersekretion der ECL-

Zellen wieder (265). Eine genauere Erläuterung findet sich in Abschnitt 2.3.2.1 der Literaturdiskussion.

Der Anteil CgA-positiver Patienten mit AG von 38,4% in unserer Studie (*Tabelle 12*) bestätigt eine zuvor stattgefundenene Untersuchung (41% CgA-Positive) (63). Diverse Studien stellen signifikant höhere CgA-Spiegel in Patienten mit AG als in den Kontrollgruppen fest (62, 69, 227). In Übereinstimmung mit diesen Daten weist auch unser AG-Kollektiv signifikant höhere CgA-Serumspiegel als die RG auf (*Tabelle 13*, *Tabelle 14*). Die höchsten CgA-Werte sind bei AG-Patienten mit zusätzlich histologisch nachgewiesenem Magenkarzinoid und/oder ECL-Zellhyperplasie bzw. -dysplasie messbar (62).

Die aktuell zur serologischen Diagnostik von AG eingesetzten Auto-AK unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität. So weist IFA eine Spezifität von 100% bei einer geringen Sensitivität von 27% auf. PCA erkennt AG mit einer Sensitivität von 81%, allerdings ist PCA IFA in der Spezifität um 10 Prozentpunkte unterlegen (223). Die Analyse unserer ROC-Kurven bekräftigt den klinischen Einsatz von PCA zur Diagnostik von AG und verdeutlicht, dass der diagnostische Wert von CgA den von IFA übertrifft, allerdings unterhalb des diagnostischen Wertes von PCA liegt (*Abbildung 15*). Beachtenswert in diesem Zusammenhang ist, dass PCA-positive Patienten signifikant höhere CgA-Werte aufweisen als Patienten ohne AK. In der Literatur sind hierfür signifikante Korrelationen von $r = 0,42$ für T1D-Patienten (266) und $r = 0,431$ für Patienten mit AD (194) beschrieben. Die Kombination der binären Serummarker, PCA plus CgA oder IFA, erzielt eine signifikante Verbesserung der Sensitivität und Spezifität für AG (*Abbildung 16*). Schließlich gelingt hier der Beweis einer erhöhten Vorhersagekraft für AG durch die Einbeziehung von CgA in die Kombination aus PCA und IFA. Die AG-Quote erhöht sich durch einen positiven CgA-Wert um den Faktor 6,5 ($p = 0,031$) bei ebenfalls positivem PCA und IFA (*Tabelle 17*). Möglicherweise kann diese Verknüpfung auch die klinische Aktivität widerspiegeln und als Verlaufparameter dienen. Die für diese Studie erhobenen Daten und Analysen zeigen somit, dass CgA als potentieller und in der Routinediagnostik einsetzbarer Serummarker dienen könnte.

Diese Studie bestätigt zudem die bereits in zahlreichen Literaturen postulierte positive, hoch signifikante Korrelation von Serum-Gastrin und Serum-CgA (*Tabelle 16*) (62, 63, 65, 265, 266). Infolge einer verminderte Säuresekretion bei PPI-Einnahme oder AG kommt es durch das fehlende negative Feedback zu einer Hypergastrinämie, die

wiederum mit erhöhten CgA-Blutkonzentrationen einhergeht, welche vermutlich durch eine ECL-Zellhyperplasie bedingt sind (226, 265).

Typ 1 Diabetes mellitus und Chromogranin A

Wie zuvor beschrieben ist CgA eines der multiplen Antigene, die an der Pathogenese des T1D beteiligt sind (149). Als Target triggert CgA bzw. ein Derivat die CD4+ Th1-Zellantwort in T1D (128, 149, 151, 152). Die Langerhans-Inselzellen exprimieren CgA und das für T1D wichtige Spaltprodukt WE-14 kommt v.a. in den sekretorischen Granula der Beta-Zellen vor (1, 128, 151). Zwei Gründe sorgen überwiegend für die wichtige Rolle von WE-14 in der Formation der Autoimmunität:

1.) Die Antigenität steigt aufgrund der PTM, welche innerhalb der sekretorischen Granula bedingt durch zellulären Stress stattfindet (128, 151). Dies kann u.a. durch die Gewebstransglutaminase bedingt sein (128, 151), die bereits zur Potenzierung der Immunität der Glutenpeptide in CD beiträgt, indem sie eine verbesserte Bindungsaffinität zu den für CD prädisponierenden HLA-DQ2/-DQ8 erzeugt (108). Die Diversität der PTM in verschiedenen Geweben des Körpers könnte auch erläutern, weshalb CgA und seine Derivate in vielen Zellarten vorkommen, jedoch nicht überall Autoimmunreaktionen auslösen (152).

2.) Das atypische Bindungsverhalten sorgt für eine Affinitätserhöhung von WE-14 zu den MHC-II-Molekülen der antigenpräsentierenden Zellen. Dies gilt sowohl bereits vor als auch verstärkt nach der PTM (128, 151, 152).

Die hohe Prävalenz von über den Grenzwert erhöhter CgA-Spiegel (39,3%) in Patienten mit T1D ist im Rahmen dieser Erkenntnisse plausibel (*Tabelle 12*). Der Übertragungsaspekt von Erkenntnissen aus Zell- bzw. Tiermodellen auf den Menschen bleibt dabei stets zu berücksichtigen (152). Vorteilhaft hierfür ist, dass das Protein WE-14 der Maus quasi identisch zu jenem des Menschen ist (152, 267).

Das vermehrt vorhandene, zirkulierende CgA in T1D könnte auf der Interaktion autoreaktiver T-Zellen mit residualen Inselzellen beruhen, die möglicherweise die CgA-Sekretion stimuliert. Die Zerstörung der Beta-Zellen kann ebenfalls eine vermehrte CgA-Freisetzung ins Blut bewirken. Trotz des Verlustes dieser Zellen, könnte die CgA enthaltenden Alpha-Zellen (268) weiterhin zur CgA-Exozytose infolge der Inflammation angeregt werden. Offen bleibt, inwiefern die PTM die CgA-Messung beeinflussen kann.

Eine weitere mögliche Erklärung der erhöhten CgA-Serumspiegel in T1D, könnte eine bis dato noch nicht diagnostizierte Autoimmunerkrankung sein. Das Clustering von

Autoimmunerkrankungen ist bekannt. So beträgt die Prävalenz einer weiteren autoimmunen Störung in Patienten mit T1D laut einer repräsentativen Studie 27% (112, 269). Die Prävalenz einer AG in T1D-Patienten ist um das drei- bis fünffache erhöht und liegt bei 5-10% (270, 271). PCA finden sich sogar in ca. 20% der T1D-Patienten (266, 270, 271) und vermehrt bei Patienten mit Anti-GAD-AK (270, 272).

Wenngleich in der vorliegenden Arbeit keiner der T1D-Patienten klinische Zeichen einer AG aufweist, könnte ein frühes nicht-diagnostiziertes Stadium der AG ebenfalls einen Anstieg des CgA-Serumspiegels bewirken. Derzeit werden die PCA als Screening für eine AG in T1D verwendet (270). Der Nutzen von CgA in diesem Zusammenhang könnte für zukünftige Studien interessant sein.

Die Assoziation der CgA-Serumkonzentrationen und T1D ist bisher nicht untersucht worden (143), sodass keine Studien zum Vergleich herangezogen werden können. Das Risiko von über den Grenzwert liegenden CgA-Serumspiegel ist mit einem OR von 15,91 ($p < 0,0001$) deutlich erhöht (*Tabelle 13*). Weitere Untersuchungen zu diesem Zusammenhang könnten somit von diagnostischer Bedeutung sein.

Autoimmunthyreopathie (GD und HT) und Chromogranin A

Der Zusammenhang zwischen erhöhten CgA-Serumkonzentrationen und Hyperthyreose ist bisher in einer kontrollierten Studie mit 38 GD-Patienten und 86 gesunden Kontrollen erörtert worden. Die CgA-Werte sind im Kollektiv der unbehandelten Hyperthyreose signifikant zur Kontrollgruppe erhöht ($p = 0,024$). Auch ist eine signifikante Korrelation von CgA mit fT3 ($r = 0,5$, $p = 0,0089$) und fT4 ($r = 0,46$, $p = 0,015$) erkennbar. Nach Erhalt einer Euthyreose und einer insgesamt sechsmonatigen Thyreostatika-Therapie mit Carbimazol sinken die CgA-Werte auf ein mit dem Kontrollkollektiv vergleichbares Niveau (173).

In unserer Arbeit unterscheiden sich die CgA-Werte des GD-Kollektivs ebenfalls signifikant von der RG (*Tabelle 13, Tabelle 14*). Die Chance einer positiven CgA-Messung ist 4,06-mal so hoch wie in der RG ($p = 0,006$). So zeigen 19,1% der GD-Patienten CgA-Werte über dem Grenzwert (*Tabelle 12*). In der Studie von *Al-Shoumer et al. (2009)* sind sogar 68,4% der Werte über dem 95%-KI (173). Diese Differenz beruht vermutlich auf der Zusammensetzung der GD-Kollektivs. Während das Einschlusskriterium in unserer Studie ein diagnostizierter GD ist, sind bei der Vergleichsstudie alle Patienten zunächst unbehandelt. Später zeigt die Studie von *Al-Shoumer et al. (2009)*, dass die CgA-Werte mit der Behandlung abnehmen (173), was den geringeren Anteil in unserer Arbeit erklärt. Zudem ist der direkte Vergleich der M

± SD der CgA-Konzentrationen aufgrund einer anderen Messmethode (BRAHMS Kryptor compact plus, Hennigsdorf, Deutschland versus (vs.) ELISA, Dako A/S, Glostrup, Denmark) erschwert (173).

Die pathophysiologischen Zusammenhänge, welche eine CgA-Erhöhung bei Hyperthyreose bewirken, sind unbekannt. Es wird allerdings vermutet, dass die durch Schilddrüsenhormone bedingte, gesteigerte Sympathikusaktivität (273, 274) mit einer gesteigerten CgA-Freisetzung einhergeht (173). Man geht davon aus, dass ein direkter Zusammenhang zwischen CgA und Hyperthyreose bei GD besteht, sodass der mögliche Einsatz von CgA zur Bestimmung der Krankheitsaktivität postuliert wurde (173).

Im Vergleich zum GD-Kollektiv ist nur ein sehr geringer Anteil der HT-Patienten (8,2%) gemäß unserer Definition (Serum-CgA \geq 98 ng/ml) CgA-positiv (*Tabelle 12*). Zudem besteht kein signifikanter Unterschied zur RG (*Tabelle 13, Tabelle 14*). Überträgt man die oben gewonnene Erkenntnis der Korrelation von CgA mit fT3 und fT4 (173) auf das HT-Kollektiv, so erscheinen die niedrigen CgA-Spiegel aufgrund der Hypothyreose plausibel. Diese Beobachtungen werden von einer Studie gestützt, die ebenfalls keine signifikante Differenz zwischen dem HT-Kollektiv und der Kontrollgruppe erkennt (183). Die Arbeitsgruppe zeigt außerdem, dass die Hormonersatztherapie und die damit erlangte Euthyreose keine signifikante Veränderung im CgA-Plasmaspiegel bei HT-Patienten bewirkt (183). Unsere Daten sind im Vergleich zur Arbeit von *Polikar et al. (1990)* (183) aktuell, bestehen aus einem deutlich größeren HT-Kollektiv (85 vs. 11 Patienten) und sind mithilfe des Kryptors, einer für CgA präzisen Messmethode, bestimmt (vs. nicht näher definierter Radioimmunassay).

M. Addison und Chromogranin A

El Ali et al. (2010) erörtert als bisher einziger Autor den Zusammenhang zwischen CgA und AD, indem er den klinischen Nutzen von CgA als serologischen Marker bei 40 Patienten mit primärer NNR-Insuffizienz untersucht (194). Mit 27,5% ist der Anteil der AD-Patienten, die in seiner Studie über den Grenzwert erhöhte Serum-CgA-Spiegel aufzeigen (194), ungefähr doppelt so hoch wie in unserer Studie. Die Anzahl der eingeschlossenen Patienten ist vergleichbar, allerdings unterscheiden die Kollektive sich in der Aufteilung der häufig mit AD assoziierten Autoimmunkrankheiten (T1D, HT, GD, AG) und im Prozentsatz der PCA-Positiven (60% (194) vs. 33,3%). Die Vergleichsstudie verdeutlicht, dass AD-Patienten mit erhöhten PCA-Leveln signifikant höhere CgA-Werte haben als jene mit normalen PCA-Spiegeln ($p = 0,0036$) (194).

Zwischen diesen Parametern besteht zudem eine positive Korrelation ($r = 0,431$, $p = 0,005$) (194). Dies könnte u.a. den oben beschriebenen Unterschied an CgA-Positiven erläutern. Auch das vom Kryptor abweichende Messsystem (CIS bio international) kann Abweichungen erklären (194).

Als mögliche Ursachen der CgA-Erhöhung wird zum einen die vermehrte Sekretion aus dem Hypophysenvorderlappen vermutet, da AD-Patienten erhöhte ACTH-Werte zeigen (194). Zum anderen geht diese Erkrankung mit einem erhöhten Risiko einher, weitere Autoimmunerkrankungen zu entwickeln. Die erhöhten CgA-Werte v.a. im Zusammenhang mit erhöhten PCA-Werten können somit auch ein Hinweis auf einen beginnenden autoaggressiven Prozess des Magens mit möglicher ECL-Zellhyperplasie hindeuten (194). Im Gegensatz dazu steht die verminderte Adrenalinsynthese des Nebennierenmarks, die durch eine niedrigere Glukokortikoidsynthese in AD bedingt sein kann (275). Dieser Mechanismus ginge allerdings mit erniedrigten CgA-Spiegeln einher, was ggf. die fehlende Signifikanz im Unterschied zur RG erläutern kann (*Tabelle 13, Tabelle 14*).

Adulte Autoimmun-Polyendokrinopathie und Chromogranin A

Die Datenlage in Bezug auf die Bedeutung von CgA für AP ist unzureichend. Diese Arbeit betrachtet deshalb Serumkonzentrationen von 98 AP-Patienten (überwiegend Typ III) und zeigt, dass die Chance von über dem Grenzwert erhöhten CgA-Werten um das 4,29-fache in AP im Vergleich zur RG erhöht ist ($p = 0,003$) (*Tabelle 13*). Die bereits gesammelten Informationen über die Erkrankungen, welche den Großteil der adulten AP ausmachen, lassen vermuten, dass CgA in polyglandulären im Gegensatz zu monoglandulären Autoimmunerkrankungen deutlich erhöht ist. Dafür würde auch die Summe der CgA erhöhenden Mechanismen sprechen, die sich aus den Mechanismen der einzelnen Erkrankungen zusammensetzt. In der Tat stellt das AP-Kollektiv nach NET, T1D und AG den höchsten Anteil CgA-Positiver (*Tabelle 12*). Inwieweit dies auch durch den hohen Prozentsatz an PPI-Einnahme bedingt ist, bleibt offen (*Tabelle 11*). Möglicherweise könnte CgA als Biomarker und Vorbote für das Auftreten einer zweiten endokrinen Autoimmunkrankheit dienen und somit die Dauer der Diagnosestellung einer AP verkürzen. Dies sollte im Rahmen weiterer Studien geprüft werden. Aufgrund sehr diversen Verhaltens beteiligter Erkrankungen könnte es auch von deren Kombinationen abhängen.

Zöliakie und Chromogranin A

Zahlreiche Studien beschreiben das vermehrte Vorkommen neuroendokriner Zellen in unbehandelter (246-251) und refraktärer CD (252). *Di Sabatino et al. (2014)* ist der erste Wissenschaftler, der zusätzlich signifikant erhöhte CgA-Serumspiegel in Patienten mit refraktärer CD im Vergleich zur CD vor bzw. nach glutenfreier Diät beobachtet (252). Es wird vermutet, dass die Interaktion der neuroendokrinen Zellen des Intestinums mit den Immunzellen eine Modulation der Entzündung und eine durch Zytokine gesteuerte neuroendokrine Zellhyperplasie bewirkt (252, 276). Da eben jene endokrinen Zellen zur CgA-Expression fähig sind (277, 278), erwartet man erhöhte CgA-Blutkonzentrationen. Dieser Zusammenhang zwischen der Anzahl CgA-positiver Zellen in der Duodenalmukosa und den CgA-Serumspiegeln erweist sich jedoch als nicht signifikant (252). Der Vergleich mit der zuvor genannten Studie fällt aufgrund der Kollektivzusammensetzung schwer, da die zitierte Arbeit die Extremform der CD betrachtet (252). Unser gemischtes CD-Kollektiv weist hingegen nur einen geringen Prozentsatz CgA-positiver Patienten auf (*Tabelle 12*). Auch der hohe Anteil an unter 18-Jährigen (30,6%) (*Tabelle 11*) kann möglicherweise niedrigere CgA-Werte bewirken, da das Alter einen signifikanten Einfluss auf CgA haben kann (*Tabelle 14*)(66). Die CgA-Serumkonzentration unserer CD-Patienten liegt mit einem Median von 40,92 ng/ml (25./75. Perzentile: 32 ng/ml/ 56,7 ng/ml) innerhalb des Bereichs der unbehandelten (Median: 50ng/ml) und mit glutenfreier Therapie behandelten (Median: 33.5 ng/ml) CD-Patienten der im Jahr 2014 veröffentlichten Studie (252).

5.2 Einflussfaktoren auf den Chromogranin A-Serumspiegel

Die logistischen und linearen Regressionsmodelle ermöglichen uns, Faktoren mit Einfluss auf CgA zu identifizieren.

Der CgA-Serumspiegel sowie die CgA-Positivität bleiben vom Geschlecht der Patienten unberührt (*Tabelle 13, Tabelle 14*). Der fehlende Einfluss des Geschlechtes ist auch in zahlreichen anderen Studien beschrieben (3, 63, 66, 69, 265). Das Geschlecht spielt allerdings im Rahmen der Autoimmunerkrankungen eine wichtige Rolle. So überwiegt in den einzelnen Erkrankungen der Anteil des weiblichen Geschlechts (Ausnahme T1D) und 65% aller betroffenen Autoimmun-Patienten sind Frauen im gebärfähigen Alter (13). Der fehlende Einfluss auf CgA lässt sich möglicherweise durch ein entdecktes *Östrogen-Response-Element* des für CgA

codierenden DNA-Bereichs erklären, wo die Bindung von Östrogen eine Downregulation der CgA-Expression bewirken kann (21, 279-281).

Ein geringer, jedoch hoch signifikanter Einfluss des Alters pro Jahr auf CgA wird in dieser Arbeit bewiesen (*Tabelle 13, Tabelle 14*). Das Ergebnis ist im Einklang mit einer zuvor publizierten Studie (66). Andere Analysen hingegen bestätigen diesen Zusammenhang nicht (3, 69, 265).

Ein häufig beobachtetes Phänomen ist die CgA-Erhöhung infolge der PPI-Einnahme (6, 65, 66, 265, 282, 283). Man geht auch hier davon aus, dass der Anstieg der CgA-Spiegel durch eine Hypergastrinämie bei verminderter Säuresekretion bedingt ist (3). Die CgA-Werte stellen zunächst vermutlich eine Überfunktion der ECL-Zellen und langfristig eine ECL-Hyperplasie dar (6, 65, 265). Die CgA-Spiegel sind bei langfristiger PPI-Einnahme signifikant erhöht und korrelieren positiv mit der Dauer der Therapie (65). Bereits eine kurzzeitige Behandlung ($18,8 \pm 2,4$ Tage) mit niedrigdosiertem Omeprazol induziert einen signifikanten CgA-Anstieg (um $93 \pm 20\mu\text{g/l}$) (66). Auch unsere Ergebnisse bekräftigen den positiven und hoch signifikanten Einfluss der PPI-Einnahme auf die CgA-Serumspiegel (*Tabelle 13, Tabelle 14*).

Laut *Louthan (2011)* fördert Nikotin die Biosynthese von CgA (2). Eine Untersuchung auf Zellebene unterstützt diese Erkenntnis und zeigt eine erhöhte CgA-Produktion nach Nikotinbehandlung von paradontalen Fibroblasten (8). Unsere Analyse untersucht als Erste die Bedeutung des Nikotinkonsums auf die humanen CgA-Serumspiegel und stellt dabei einen signifikanten Einfluss von aktivem Nikotinkonsum fest (*Tabelle 14*). Abstinente Raucher unterscheiden sich hingegen in Bezug auf CgA nicht von Nicht-Rauchern (*Tabelle 14*).

Die Wirkung der einzelnen Autoimmunerkrankungen auf die CgA-Serumspiegel ist bereits in Abschnitt 5.1 diskutiert worden. Zusammenfassend haben die Autoimmunerkrankungen T1D, AG, AP, GD einen signifikanten Einfluss auf die CgA-Positivität. Im linearen Regressionsmodell erweisen sich T1D, AG, GD, CD, AP und Rel sowie die Positivkontrolle NET als positive Prädiktoren des CgA-Serumspiegels.

5.3 Diskussion der Messmethode

Abschnitt 2.1.3 der Literaturdiskussion gibt einen Überblick über die diversen Messmethoden. Assays können sich neben der zugrundeliegenden Methode auch in der Auswahl der Aminosäuresequenzen von CgA als Epitope der AK und der Klonalität der AK (monoklonal vs. polyklonal) differenzieren. In der Handhabung unterscheiden

sich die Assays teilweise im Standard der Kalibrierung, in der Dauer der Versuchsdurchführung, in der Erstellung von Verdünnungsreihen, in den Einheiten sowie den Grenz-/Referenzwerten (38, 71, 72).

Der in dieser Studie verwendete Kryptor basiert auf einem Sandwich-Immunassay mit der TRACE-Technologie (71, 256). Zur standardisierten Kalibrierung wird ein rekombinantes humanes CgA verwendet (38, 72). Weitere Besonderheiten des Kryptors sind die automatische Probenverdünnung sowie der kurze Testzeitraum (29 min) (71). Das CisBio-Kit beruht im Vergleich zum hier eingesetzten Kryptor auf einem Sandwich-Radioimmunassay mit monoklonalen AK, die CgA 145-197 und CgA 198-245 als ihre Epitope erkennen. Die standardisierte Kalibrierung sowie die Messeinheit in ng/ml bzw. µg/l entsprechen den Eigenschaften des Kryptors. Allerdings bedarf das CisBio-Assay einer manuellen Verdünnung und benötigt einen längeren Testzeitraum von ca. 18 Stunden (38, 71, 72). Die Unterschiede dieser Assays führen entsprechend zu differierenden Ergebnissen unter Verwendung identischer Proben (6). Laut einer Studie mit 406 Patienten sind die gemessenen CgA-Konzentrationen im Kryptor durchschnittlich signifikant höher als im CisBio-Assay ($p = 0,012$) (71). Eine weitere Studie bestätigt die Abweichung der genannten Assays mit einer Mittelwertsdifferenz von -10 ng/ml (SD = 116) (72).

Die Reproduzierbarkeit eines Assays lässt sich mithilfe der Intra- und Inter-Assay-Variationskoeffizienten (VK) beschreiben. Innerhalb einer Assay-Platte und im Konzentrationsbereich von 30 ng/ml - 1000 ng/ml erzielt der Kryptor laut Hersteller VK von < 3% bis < 7%. Der Inter-Assay-VK liegt abhängig von der Konzentration zwischen < 6% und < 12% (258). Die Reproduzierbarkeit des Kryptor-Assays ist vergleichbar mit jenen der Radio- bzw. Enzymimmunassays (69, 85, 226, 284) und sollte somit nicht zu Abweichungen in Messergebnissen zwischen verschiedenen Assay-Verfahren führen.

Die zuvor dargestellte Heterogenität der CgA-Messung erschwert den Vergleich von Studienergebnisse. Die fehlende internationale Standardisierung der Methodik wird in der Literatur wiederholt kritisiert (3, 6, 38, 67, 71, 72, 143).

Ein einheitlicher Standard könnte sowohl die Forschung zu CgA vorantreiben, als auch die Interpretation der Werte bspw. im Rahmen der Verlaufskontrolle von NET erleichtern.

5.4 Limitationen

Im Folgenden werden einige Limitationen der vorliegenden Studie diskutiert.

Das Studiendesign in Form einer Querschnittstudie erlaubt keine klare Beurteilung der dynamischen Veränderungen der CgA-Spiegel und CgA-Positivität vor, während und nach erfolgreicher medikamentöser Behandlung oder Intervention. Der direkte Vergleich mit anderen Studienergebnissen ist aufgrund der Differenzen im Behandlungsstatus erschwert.

Der fehlende Ausschluss von Patienten mit Erkrankungen, die bekanntermaßen Einfluss auf das im Blut zirkulierende CgA haben, kann falsch-hohe bzw. falsch-positive CgA-Spiegel zur Folge haben (1, 2). Zur Eindämmung dieser Verzerrung sind allerdings nur jene Patientendaten in die Studie eingeschlossen worden, die entweder CgA-Werte im Referenzbereich haben und/oder deren krankheitsbezogenen Parameter (z.B. Kreatinin) zum Zeitpunkt der Blutentnahme im Normbereich lagen. Um den Einfluss von PPI auf CgA weitgehend zu eliminieren, gelten Patienten in unserer Studie erst 14 Tage nach Absetzen der Medikation als unbehandelt. Laut Literatur kann man bereits ab dem 5. bis 7. Tag nach Absetzen der PPI-Therapie mit normalen CgA-Blutkonzentrationen rechnen (285). Aufgrund des retrospektiven Studienformats kann jedoch die nicht-erfasste Einnahme von PPI bei Bedarf im Untersuchungszeitraum nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Die Homogenität der Kollektive ist nicht immer optimal, da einige Patienten an mehr als einer Autoimmunerkrankung leiden. Die häufige Koexistenz dieser Erkrankungen ist in der Literatur ausführlich beschrieben. So entwickeln 30% der T1D Patienten eine AIT, meist HT (269), 5-10% eine AG (270) und 4-9% eine CD (157). Patienten mit AIT erkranken in 10% der Fälle an T1D und in 33% an AG (200). Auch AG-Patienten zeigen ein gehäuftes Auftreten weiterer Autoimmunerkrankungen (bspw. 40% AIT (286), 10% T1D (195)) (270). Es besteht somit die Möglichkeit, dass das gemessene Serum-CgA ebenfalls durch eine sich neu entwickelnde, bisher nicht diagnostizierte zusätzliche Autoimmunerkrankung beeinflusst wird. So haben bspw. HT-Patienten, die eine AG diagnostiziert bekommen, erhöhte CgA-Werte (184, 186).

Nach Darstellung des Alterseinflusses auf die CgA-Werte stellt sich zudem die Frage inwieweit die fehlende Vorgabe altersspezifischer Referenzwerte ein Bias hinsichtlich der CgA-Positivität in Kollektiven mit hohem Anteil < 18-Jähriger erzeugt.

Schließlich stellt die Komplexität von CgA selbst eine große Herausforderung dar. Die hohe strukturelle und funktionale Vielfalt des Peptids und seiner Derivate verbunden mit der Diversität der Messmethoden, die wiederum unterschiedliche CgA-Epitope

und somit ggf. nur einzelne Fragmente erkennen, beschränkt die Vergleichbarkeit der Studien. Auch das Auftreten von CgA unter physiologischen Bedingungen sowie der Einfluss zahlreicher pathophysiologischen Gegebenheiten erschweren die Interpretation der CgA-Werte und die Angabe der Kausalität der CgA-Erhöhung (5, 7).

6. Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation zeigt, dass Serum-CgA in endokriner und gastrointestinaler Autoimmunität, v.a. in T1D, AG, GD und AP, eine Rolle spielt.

Das Peptid CgA ist bereits als stabiler Biomarker bei den NET etabliert (2, 6, 21, 31). Aus diesem Grund wurde die Bedeutung erhöhter CgA-Blutkonzentrationen auch in zahlreichen gastrointestinalen, kardiovaskulären und inflammatorischen Erkrankungen untersucht (4, 7, 287).

Diese groß angelegte Querschnittsstudie gibt zum ersten Mal einen Überblick über das Auftreten von Serum-CgA in diversen Autoimmunerkrankungen. Der höchste Anteil an über dem Grenzwert liegenden (≥ 98 ng/ml) CgA-Serumkonzentrationen in Autoimmunerkrankheiten wurde in Patienten mit T1D, AG, AP und GD gemessen (T1D: 39,3%, AG: 38,4%, AP: 23,5% und GD: 19,1%).

Mithilfe von Regressionsmodellen gelingt zudem der Nachweis verschiedener Einflussfaktoren auf das Serum-CgA. So kann der bereits gut erforschte Einfluss von PPI verifiziert werden. Ebenso wird ein positiv signifikanter Effekt des Alters und des aktiven Nikotinkonsums deutlich. Auch die Autoimmunerkrankungen T1D, AG, AP und GD haben einen signifikanten Einfluss auf die CgA-Positivität. Dies kann durch den signifikanten Unterschied der OR dieser Autoimmunerkrankungen (T1D, AG, AP, GD) und des OR der Referenzgruppe (TN+C) belegt werden. Hinsichtlich der stetigen CgA-Serumwerte erweist sich, neben der vier zuvor genannten Kollektive (T1D, AG, AP, GD), auch die CD als signifikanter Einflussfaktor im linearen Regressionsmodell.

Im AG-Kollektiv bestätigt diese Studie zusätzlich die positive Korrelation von LgGastrin-Serumkonzentrationen und LgCgA-Serumkonzentrationen ($r = 0,55$, $p < 0,0001$) im AG-Kollektiv.

Anhand des AG-Kollektivs wird die Wertigkeit von CgA als serologischer Marker exemplarisch getestet. Vergleicht man zunächst die in der AG-Diagnostik verwendeten Serummarker einzeln, bekräftigt die Auswertung der ROC-Kurve den klinischen Einsatz von PCA. Dies liegt darin begründet, dass PCA eine größere AUC aufweist als CgA (0,84 vs. 0,67, $p < 0,0001$). Dennoch bewahrheitet sich CgA als nützlicher Serummarker für die Diagnostik der AG. So verbessert die Kombination aus PCA, IFA und CgA die Vorhersagekraft der serologischen Erkennung einer AG. Bei bereits positivem PCA und IFA erhöht sich die Quote durch einen positiven CgA-Wert (≥ 98 ng/ml) signifikant um den Faktor 6,5 ($p = 0,031$).

Trotz der vielseitigen Erkenntnisse dieser Studie, sollte die im Verlauf der Arbeit dargestellte Komplexität von CgA und die damit einhergehenden Herausforderungen in der Interpretation der Serumkonzentrationen bei der Anwendung von CgA als serologischer Marker berücksichtigt werden. Hinzu kommt die bisher nicht standardisierte Messmethode, die die Auswertung von Folgeuntersuchungen in verschiedenen Laboren erschwert. Die enge Verbindung der Autoimmunerkrankungen sollte in weiteren Analysen ebenfalls bedacht werden.

Die zahlreichen neuen Erkenntnisse bezüglich CgA und Autoimmunität sowie die weiterhin limitierten Möglichkeiten der serologischen Früherkennung von Autoimmunerkrankungen sollten weitere Untersuchungen in diesem Themengebiet veranlassen.

So sollte sowohl die Verwendung von CgA als Biomarker in der Routinediagnostik als auch der Nutzen von CgA als Verlaufsparemeter von Autoimmunerkrankungen im Rahmen weiterer prospektiver Studien mit großen einzelnen Kollektiven genauer untersucht werden.

7. Literaturverzeichnis

1. Taupenot L, Harper KL, O'Connor DT. The chromogranin-secretogranin family. *The New England journal of medicine*. 2003;348(12):1134-49.
2. Louthan O. Chromogranin a in physiology and oncology. *Folia Biol (Praha)*. 2011;57(5):173-81.
3. d'Herbomez M, Do Cao C, Vezzosi D, Borzon-Chasot F, Baudin E. Chromogranin A assay in clinical practice. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2010;71(4):274-80.
4. Loh YP, Cheng Y, Mahata SK, Corti A, Tota B. Chromogranin A and derived peptides in health and disease. *Journal of molecular neuroscience : MN*. 2012;48(2):347-56.
5. Marotta V, Zatelli MC, Sciammarella C, Ambrosio MR, Bondanelli M, Colao A, et al. Chromogranin A as circulating marker for diagnosis and management of neuroendocrine neoplasms: more flaws than fame. *Endocr Relat Cancer*. 2018;25(1):R11-r29.
6. Modlin IM, Gustafsson BI, Moss SF, Pavel M, Tsolakis AV, Kidd M. Chromogranin A--biological function and clinical utility in neuro endocrine tumor disease. *Annals of surgical oncology*. 2010;17(9):2427-43.
7. Corti A, Marcucci F, Bachetti T. Circulating chromogranin A and its fragments as diagnostic and prognostic disease markers. *Pflugers Arch*. 2018;470(1):199-210.
8. Sadaoka S, Yagami K, Maki S. Nicotine in cigarettes promotes chromogranin A production by human periodontal ligament fibroblasts. *Arch Oral Biol*. 2013;58(8):1029-33.
9. Zhernakova A, Kurilshikov A, Bonder MJ, Tigchelaar EF, Schirmer M, Vatanen T, et al. Population-based metagenomics analysis reveals markers for gut microbiome composition and diversity. *Science*. 2016;352(6285):565-9.
10. Di Comite G, Rossi CM, Marinosci A, Lolmede K, Baldissera E, Aiello P, et al. Circulating chromogranin A reveals extra-articular involvement in patients with rheumatoid arthritis and curbs TNF-alpha-elicited endothelial activation. *J Leukoc Biol*. 2009;85(1):81-7.
11. Ferrero E, Corti A, Haroche J, Belloni D, Colombo B, Berti A, et al. Plasma Chromogranin A as a marker of cardiovascular involvement in Erdheim-Chester disease. *Oncoimmunology*. 2016;5(7):e1181244.
12. Wang L, Wang FS, Gershwin ME. Human autoimmune diseases: a comprehensive update. *J Intern Med*. 2015;278(4):369-95.
13. Rink LK, Andreas; Haase,Hajo. *Immunologie für Einsteiger* Berlin: Springer; 2012. p. 4-17, 169-83.
14. Kahaly GJ, Frommer L, Schuppan D. Celiac disease and endocrine autoimmunity - the genetic link. *Autoimmunity reviews*. 2018;17(12):1169-75.
15. Kahaly GJ, Frommer L, Schuppan D. Celiac Disease and Glandular Autoimmunity. *Nutrients*. 2018;10(7).
16. Hansen MP, Wunderlich SA, Storz SM, Matheis N, Knuf M, Kahaly GJ. [The polyglandular autoimmune syndrome--quality of life and family clustering]. *Deutsche medizinische Wochenschrift*. 2014;139(38):1876-82.
17. Frommer L, Kahaly GJ. Autoimmune Polyendocrinopathy. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2019.
18. Caturegli P, De Remigis A, Rose NR. Hashimoto thyroiditis: clinical and diagnostic criteria. *Autoimmunity reviews*. 2014;13(4-5):391-7.
19. Pulzer A, Burger-Stritt S, Hahner S. [Addison's disease : Primary adrenal insufficiency]. *Internist (Berl)*. 2016;57(5):457-69.

20. Schuppan D. [Celiac disease : Pathogenesis, clinics, epidemiology, diagnostics, therapy]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 2016;59(7):827-35.
21. Feldman SA, Eiden LE. The chromogranins: their roles in secretion from neuroendocrine cells and as markers for neuroendocrine neoplasia. *Endocr Pathol*. 2003;14(1):3-23.
22. O'Connor DT, Frigon RP. Chromogranin A, the major catecholamine storage vesicle soluble protein. Multiple size forms, subcellular storage, and regional distribution in chromaffin and nervous tissue elucidated by radioimmunoassay. *J Biol Chem*. 1984;259(5):3237-47.
23. Banks P, Helle K. The release of protein from the stimulated adrenal medulla. *Biochem J*. 1965;97(3):40c-1c.
24. Blaschko H, Comline RS, Schneider FH, Silver M, Smith AD. Secretion of a chromaffin granule protein, chromogranin, from the adrenal gland after splanchnic stimulation. *Nature*. 1967;215(5096):58-9.
25. Gorr SU, Shioi J, Cohn DV. Interaction of calcium with porcine adrenal chromogranin A (secretory protein-I) and chromogranin B (secretogranin I). *Am J Physiol*. 1989;257(2 Pt 1):E247-54.
26. Yoo SH, Albanesi JP. High capacity, low affinity Ca²⁺ binding of chromogranin A. Relationship between the pH-induced conformational change and Ca²⁺ binding property. *J Biol Chem*. 1991;266(12):7740-5.
27. Murray SS, Deaven LL, Burton DW, O'Connor DI, Mellon PL, Deftos LJ. The gene for human chromogranin A (CgA) is located on chromosome 14. *Biochem Biophys Res Commun*. 1987;142(1):141-6.
28. Rosa P, Gerdes HH. The granin protein family: markers for neuroendocrine cells and tools for the diagnosis of neuroendocrine tumors. *Journal of endocrinological investigation*. 1994;17(3):207-25.
29. Hendy GN, Bevan S, Mattei MG, Mouland AJ. Chromogranin A. *Clin Invest Med*. 1995;18(1):47-65.
30. Rausch DM, Iacangelo AL, Eiden LE. Glucocorticoid- and nerve growth factor-induced changes in chromogranin A expression define two different neuronal phenotypes in PC12 cells. *Mol Endocrinol*. 1988;2(10):921-7.
31. Nobels FR, Kwekkeboom DJ, Bouillon R, Lamberts SW. Chromogranin A: its clinical value as marker of neuroendocrine tumours. *Eur J Clin Invest*. 1998;28(6):431-40.
32. Koeslag JH, Saunders PT, Wessels JA. The chromogranins and the counter-regulatory hormones: do they make homeostatic sense? *J Physiol*. 1999;517 (Pt 3):643-9.
33. Montero-Hadjadje M, Elias S, Chevalier L, Benard M, Tanguy Y, Turquier V, et al. Chromogranin A promotes peptide hormone sorting to mobile granules in constitutively and regulated secreting cells: role of conserved N- and C-terminal peptides. *J Biol Chem*. 2009;284(18):12420-31.
34. Metz-Boutigue MH, Garcia-Sablone P, Hogue-Angeletti R, Aunis D. Intracellular and extracellular processing of chromogranin A. Determination of cleavage sites. *Eur J Biochem*. 1993;217(1):247-57.
35. Jiang Q, Taupenot L, Mahata SK, Mahata M, O'Connor DT, Miles LA, et al. Proteolytic cleavage of chromogranin A (CgA) by plasmin. Selective liberation of a specific bioactive CgA fragment that regulates catecholamine release. *J Biol Chem*. 2001;276(27):25022-9.
36. Iacangelo AL, Eiden LE. Chromogranin A: current status as a precursor for bioactive peptides and a granulogenic/sorting factor in the regulated secretory pathway. *Regulatory peptides*. 1995;58(3):65-88.

37. Barbosa JA, Gill BM, Takiyyuddin MA, O'Connor DT. Chromogranin A: posttranslational modifications in secretory granules. *Endocrinology*. 1991;128(1):174-90.
38. Stridsberg M, Eriksson B, Oberg K, Janson ET. A comparison between three commercial kits for chromogranin A measurements. *J Endocrinol*. 2003;177(2):337-41.
39. Portela-Gomes GM, Stridsberg M. Selective processing of chromogranin A in the different islet cells in human pancreas. *J Histochem Cytochem*. 2001;49(4):483-90.
40. Deftos LJ, Gazdar AF, Hogue-Angeletti R, Mullen PS, Burton DW. Distinct patterns of chromogranin A-related species can be demonstrated in endocrine cells. *Bone Miner*. 1990;9(3):169-78.
41. Zhao E, Zhang D, Basak A, Trudeau VL. New insights into granin-derived peptides: evolution and endocrine roles. *Gen Comp Endocrinol*. 2009;164(2-3):161-74.
42. Helle KB. The granin family of uniquely acidic proteins of the diffuse neuroendocrine system: comparative and functional aspects. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2004;79(4):769-94.
43. Ratti S, Curnis F, Longhi R, Colombo B, Gasparri A, Magni F, et al. Structure-activity relationships of chromogranin A in cell adhesion. Identification of an adhesion site for fibroblasts and smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 2000;275(38):29257-63.
44. Sanchez-Margalet V, Lucas M, Goberna R. Pancreastatin: further evidence for its consideration as a regulatory peptide. *J Mol Endocrinol*. 1996;16(1):1-8.
45. Sanchez-Margalet V, Gonzalez-Yanes C, Najib S, Santos-Alvarez J. Metabolic effects and mechanism of action of the chromogranin A-derived peptide pancreastatin. *Regulatory peptides*. 2010;161(1-3):8-14.
46. Gonzalez-Yanes C, Sanchez-Margalet V. Pancreastatin modulates insulin signaling in rat adipocytes: mechanisms of cross-talk. *Diabetes*. 2000;49(8):1288-94.
47. Cadman PE, Rao F, Mahata SK, O'Connor DT. Studies of the dysglycemic peptide, pancreastatin, using a human forearm model. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;971:528-9.
48. Fasciotto BH, Trauss CA, Greeley GH, Cohn DV. Parastatin (porcine chromogranin A347-419), a novel chromogranin A-derived peptide, inhibits parathyroid cell secretion. *Endocrinology*. 1993;133(2):461-6.
49. Lugardon K, Chasserot-Golaz S, Kieffer AE, Maget-Dana R, Nullans G, Kieffer B, et al. Structural and biological characterization of chromofungin, the antifungal chromogranin A-(47-66)-derived peptide. *J Biol Chem*. 2001;276(38):35875-82.
50. Lugardon K, Raffner R, Goumon Y, Corti A, Delmas A, Bulet P, et al. Antibacterial and antifungal activities of vasostatin-1, the N-terminal fragment of chromogranin A. *J Biol Chem*. 2000;275(15):10745-53.
51. Dominguez N, Estevez-Herrera J, Borges R, Machado JD. The interaction between chromogranin A and catecholamines governs exocytosis. *Faseb j*. 2014;28(11):4657-67.
52. Courel M, Rodemer C, Nguyen ST, Pance A, Jackson AP, O'Connor D T, et al. Secretory granule biogenesis in sympathoadrenal cells: identification of a granulogenic determinant in the secretory prohormone chromogranin A. *J Biol Chem*. 2006;281(49):38038-51.
53. Kim T, Tao-Cheng JH, Eiden LE, Loh YP. Chromogranin A, an "on/off" switch controlling dense-core secretory granule biogenesis. *Cell*. 2001;106(4):499-509.
54. Helle KB. Some chemical and physical properties of the soluble protein fraction of bovine adrenal chromaffin granules. *Mol Pharmacol*. 1966;2(4):298-310.

55. Dimsdale JE, O'Connor DT, Ziegler M, Mills P. Chromogranin A correlates with norepinephrine release rate. *Life Sci.* 1992;51(7):519-25.
56. Tramonti G, Ferdeghini M, Annichiarico C, Norpoth M, Donadio C, Bianchi R, et al. Relationship between renal function and blood level of chromogranin A. *Ren Fail.* 2001;23(3-4):449-57.
57. Hsiao RJ, Mezger MS, O'Connor DT. Chromogranin A in uremia: progressive retention of immunoreactive fragments. *Kidney Int.* 1990;37(3):955-64.
58. O'Connor DT, Pandlan MR, Carlton E, Cervenka JH, Hsiao RJ. Rapid radioimmunoassay of circulating chromogranin A: in vitro stability, exploration of the neuroendocrine character of neoplasia, and assessment of the effects of organ failure. *Clin Chem.* 1989;35(8):1631-7.
59. Dieplinger B, Gegenhuber A, Struck J, Poelz W, Langsteger W, Haltmayer M, et al. Chromogranin A and C-terminal endothelin-1 precursor fragment add independent prognostic information to amino-terminal proBNP in patients with acute destabilized heart failure. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry.* 2009;400(1-2):91-6.
60. Takiyyuddin MA, Cervenka JH, Hsiao RJ, Barbosa JA, Parmer RJ, O'Connor DT. Chromogranin A. Storage and release in hypertension. *Hypertension.* 1990;15(3):237-46.
61. Takiyyuddin MA, Cervenka JH, Sullivan PA, Pandian MR, Parmer RJ, Barbosa JA, et al. Is physiologic sympathoadrenal catecholamine release exocytotic in humans? *Circulation.* 1990;81(1):185-95.
62. Peracchi M, Gebbia C, Basilisco G, Quatrini M, Tarantino C, Vescarelli C, et al. Plasma chromogranin A in patients with autoimmune chronic atrophic gastritis, enterochromaffin-like cell lesions and gastric carcinoids. *European journal of endocrinology.* 2005;152(3):443-8.
63. Borch K, Stridsberg M, Burman P, Rehfeld JF. Basal chromogranin A and gastrin concentrations in circulation correlate to endocrine cell proliferation in type-A gastritis. *Scand J Gastroenterol.* 1997;32(3):198-202.
64. Sciola V, Massironi S, Conte D, Caprioli F, Ferrero S, Ciafardini C, et al. Plasma chromogranin a in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2009;15(6):867-71.
65. Sanduleanu S, Stridsberg M, Jonkers D, Hameeteman W, Biemond I, Lundqvist G, et al. Serum gastrin and chromogranin A during medium- and long-term acid suppressive therapy: a case-control study. *Alimentary pharmacology & therapeutics.* 1999;13(2):145-53.
66. Giusti M, Sidoti M, Augeri C, Rabitti C, Minuto F. Effect of short-term treatment with low dosages of the proton-pump inhibitor omeprazole on serum chromogranin A levels in man. *European journal of endocrinology.* 2004;150(3):299-303.
67. O'Toole D, Grossman A, Gross D, Delle Fave G, Barkmanova J, O'Connor J, et al. ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Tumors: biochemical markers. *Neuroendocrinology.* 2009;90(2):194-202.
68. Rozansky DJ, Wu H, Tang K, Parmer RJ, O'Connor DT. Glucocorticoid activation of chromogranin A gene expression. Identification and characterization of a novel glucocorticoid response element. *The Journal of clinical investigation.* 1994;94(6):2357-68.
69. Campana D, Nori F, Piscitelli L, Morselli-Labate AM, Pezzilli R, Corinaldesi R, et al. Chromogranin A: is it a useful marker of neuroendocrine tumors? *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2007;25(15):1967-73.
70. O'Connor DT, Bernstein KN. Radioimmunoassay of chromogranin A in plasma as a measure of exocytotic sympathoadrenal activity in normal subjects and patients

- with pheochromocytoma. *The New England journal of medicine*. 1984;311(12):764-70.
71. van der Knaap RHP, Kwekkeboom DJ, Ramakers CRB, de Rijke YB. Evaluation of a new immunoassay for chromogranin A measurement on the Kryptor system. *Pract Lab Med*. 2015;1:5-11.
72. Popovici T, Moreira B, Schlageter MH, Bories PN. Automated two-site immunofluorescent assay for the measurement of serum chromogranin A. *Clinical biochemistry*. 2014;47(1-2):87-91.
73. Syversen U, Jacobsen MB, O'Connor DT, Ronning K, Waldum HL. Immunoassays for measurement of chromogranin A and pancreastatin-like immunoreactivity in humans: correspondence in patients with neuroendocrine neoplasia. *Neuropeptides*. 1994;26(3):201-6.
74. Woltering EA, Hilton RS, Zolfoghary CM, Thomson J, Zietz S, Go VL, et al. Validation of serum versus plasma measurements of chromogranin a levels in patients with carcinoid tumors: lack of correlation between absolute chromogranin a levels and symptom frequency. *Pancreas*. 2006;33(3):250-4.
75. Neumann J-D. Symptomatik und Diagnostik neuroendokriner Tumoren MedLearning AG 2019 [Available from: https://cme.medlearning.de/novartisoncology/neuroendokrine_tumoren_api_rez/pdf/cme.pdf].
76. Ferolla P, Faggiano A, Mansueto G, Avenia N, Cantelmi MG, Giovenali P, et al. The biological characterization of neuroendocrine tumors: the role of neuroendocrine markers. *Journal of endocrinological investigation*. 2008;31(3):277-86.
77. Gerd Herold und Mitarbeiter. *Innere Medizin*. Köln: Dr. med. Gerd Herold; 2020. p. 443-52, 71-71, 509-13, 722-805.
78. Yao JC, Hassan M, Phan A, Dagohoy C, Leary C, Mares JE, et al. One hundred years after "carcinoid": epidemiology of and prognostic factors for neuroendocrine tumors in 35,825 cases in the United States. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(18):3063-72.
79. Leoncini E, Boffetta P, Shafir M, Aleksovska K, Boccia S, Rindi G. Increased incidence trend of low-grade and high-grade neuroendocrine neoplasms. *Endocrine*. 2017;58(2):368-79.
80. Oberg K. The genetics of neuroendocrine tumors. *Semin Oncol*. 2013;40(1):37-44.
81. Modlin IM, Oberg K, Chung DC, Jensen RT, de Herder WW, Thakker RV, et al. Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Lancet Oncol*. 2008;9(1):61-72.
82. Knigge U, Capdevila J, Bartsch DK, Baudin E, Falkerby J, Kianmanesh R, et al. ENETS Consensus Recommendations for the Standards of Care in Neuroendocrine Neoplasms: Follow-Up and Documentation. *Neuroendocrinology*. 2017;105(3):310-9.
83. Nobels FR, Kwekkeboom DJ, Coopmans W, Hoekstra R, De Herder WW, Bouillon R, et al. A comparison between the diagnostic value of gonadotropins, alpha-subunit, and chromogranin-A and their response to thyrotropin-releasing hormone in clinically nonfunctioning, alpha-subunit-secreting, and gonadotroph pituitary adenomas. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1993;77(3):784-9.
84. Baudin E, Bidart JM, Bachelot A, Ducreux M, Elias D, Ruffie P, et al. Impact of chromogranin A measurement in the work-up of neuroendocrine tumors. *Ann Oncol*. 2001;12 Suppl 2:S79-82.

85. Nobels FR, Kwekkeboom DJ, Coopmans W, Schoenmakers CH, Lindemans J, De Herder WW, et al. Chromogranin A as serum marker for neuroendocrine neoplasia: comparison with neuron-specific enolase and the alpha-subunit of glycoprotein hormones. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1997;82(8):2622-8.
86. O'Connor DT, Deftos LJ. Secretion of chromogranin A by peptide-producing endocrine neoplasms. *The New England journal of medicine*. 1986;314(18):1145-51.
87. Grossrubatscher E, Dalino P, Vignati F, Gambacorta M, Pugliese R, Boniardi M, et al. The role of chromogranin A in the management of patients with pheochromocytoma. *Clinical endocrinology*. 2006;65(3):287-93.
88. Hsiao RJ, Parmer RJ, Takiyuddin MA, O'Connor DT. Chromogranin A storage and secretion: sensitivity and specificity for the diagnosis of pheochromocytoma. *Medicine (Baltimore)*. 1991;70(1):33-45.
89. Hsiao RJ, Seeger RC, Yu AL, O'Connor DT. Chromogranin A in children with neuroblastoma. Serum concentration parallels disease stage and predicts survival. *The Journal of clinical investigation*. 1990;85(5):1555-9.
90. d'Herbomez M, Forzy G, Bauters C, Tierny C, Pigny P, Carnaille B, et al. An analysis of the biochemical diagnosis of 66 pheochromocytomas. *European journal of endocrinology*. 2007;156(5):569-75.
91. Stridsberg M, Husebye ES. Chromogranin A and chromogranin B are sensitive circulating markers for pheochromocytoma. *European journal of endocrinology*. 1997;136(1):67-73.
92. Gussi IL, Young J, Baudin E, Bidart JM, Chanson P. Chromogranin A as serum marker of pituitary adenomas. *Clinical endocrinology*. 2003;59(5):644-8.
93. Cimitan M, Buonadonna A, Cannizzaro R, Canzonieri V, Borsatti E, Ruffo R, et al. Somatostatin receptor scintigraphy versus chromogranin A assay in the management of patients with neuroendocrine tumors of different types: clinical role. *Ann Oncol*. 2003;14(7):1135-41.
94. Nehar D, Lombard-Bohas C, Olivieri S, Claustrat B, Chayvialle JA, Penes MC, et al. Interest of Chromogranin A for diagnosis and follow-up of endocrine tumours. *Clinical endocrinology*. 2004;60(5):644-52.
95. Sobol RE, Memoli V, Deftos LJ. Hormone-negative, chromogranin A-positive endocrine tumors. *The New England journal of medicine*. 1989;320(7):444-7.
96. Ahmed A, Turner G, King B, Jones L, Culliford D, McCance D, et al. Midgut neuroendocrine tumours with liver metastases: results of the UKINETS study. *Endocr Relat Cancer*. 2009;16(3):885-94.
97. Tomassetti P, Migliori M, Simoni P, Casadei R, De lasio R, Corinaldesi R, et al. Diagnostic value of plasma chromogranin A in neuroendocrine tumours. *European journal of gastroenterology & hepatology*. 2001;13(1):55-8.
98. Zatelli MC, Torta M, Leon A, Ambrosio MR, Gion M, Tomassetti P, et al. Chromogranin A as a marker of neuroendocrine neoplasia: an Italian Multicenter Study. *Endocr Relat Cancer*. 2007;14(2):473-82.
99. Ferrari L, Seregni E, Bajetta E, Martinetti A, Bombardieri E. The biological characteristics of chromogranin A and its role as a circulating marker in neuroendocrine tumours. *Anticancer Res*. 1999;19(4c):3415-27.
100. Rao F, Keiser HR, O'Connor DT. Malignant pheochromocytoma. Chromaffin granule transmitters and response to treatment. *Hypertension*. 2000;36(6):1045-52.
101. Eriksson B, Oberg K, Stridsberg M. Tumor markers in neuroendocrine tumors. *Digestion*. 2000;62 Suppl 1:33-8.
102. Practice guideline neuroendocrine tumors - AWMF-Reg. 021-27. *Z Gastroenterol*. 2018;56(6):583-681.

103. Welin S, Stridsberg M, Cunningham J, Granberg D, Skogseid B, Oberg K, et al. Elevated plasma chromogranin A is the first indication of recurrence in radically operated midgut carcinoid tumors. *Neuroendocrinology*. 2009;89(3):302-7.
104. Berlin-Potsdam IfMD. Was sind Autoimmunerkrankungen? Berlin-Steglitz IMD Institut für Medizinische Diagnostik Berlin-Potsdam GbR [cited 04.11.2019. Available from: <https://www.imd-berlin.de/spezielle-kompetenzen/autoimmunerkrankungen.html>.
105. Kahaly GJ, Frommer L. Polyglandular autoimmune syndromes. *Journal of endocrinological investigation*. 2018;41(1):91-8.
106. Minalyan A, Benhammou JN, Artashesyan A, Lewis MS, Pisegna JR. Autoimmune atrophic gastritis: current perspectives. *Clin Exp Gastroenterol*. 2017;10:19-27.
107. Neumann WL, Coss E, Rugge M, Genta RM. Autoimmune atrophic gastritis--pathogenesis, pathology and management. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2013;10(9):529-41.
108. Schuppan D, Junker Y, Barisani D. Celiac disease: from pathogenesis to novel therapies. *Gastroenterology*. 2009;137(6):1912-33.
109. Kahaly GJ, Hansen MP. Type 1 diabetes associated autoimmunity. *Autoimmunity reviews*. 2016;15(7):644-8.
110. Biondi B, Kahaly GJ, Robertson RP. Thyroid Dysfunction and Diabetes Mellitus: Two Closely Associated Disorders. *Endocr Rev*. 2019;40(3):789-824.
111. Baker RL, Bradley B, Wiles TA, Lindsay RS, Barbour G, Delong T, et al. Cutting Edge: Nonobese Diabetic Mice Deficient in Chromogranin A Are Protected from Autoimmune Diabetes. *J Immunol*. 2016;196(1):39-43.
112. DiMeglio LA, Evans-Molina C, Oram RA. Type 1 diabetes. *Lancet*. 2018;391(10138):2449-62.
113. Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. Type 1 diabetes. *Lancet*. 2014;383(9911):69-82.
114. Maahs DM, West NA, Lawrence JM, Mayer-Davis EJ. Epidemiology of type 1 diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2010;39(3):481-97.
115. Mayer-Davis EJ, Lawrence JM, Dabelea D, Divers J, Isom S, Dolan L, et al. Incidence Trends of Type 1 and Type 2 Diabetes among Youths, 2002-2012. *The New England journal of medicine*. 2017;376(15):1419-29.
116. Patterson CC, Dahlquist GG, Gyurus E, Green A, Soltesz G. Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study. *Lancet*. 2009;373(9680):2027-33.
117. Rewers M, Ludvigsson J. Environmental risk factors for type 1 diabetes. *Lancet*. 2016;387(10035):2340-8.
118. Rogers MAM, Kim C, Banerjee T, Lee JM. Fluctuations in the incidence of type 1 diabetes in the United States from 2001 to 2015: a longitudinal study. *BMC Med*. 2017;15(1):199.
119. Forga Llenas L, Goni Iriarte MJ, Cambra Contin K, Ibanez Beroiz B, Chueca Guendulain M, Berrade Zubiri S. Incidence and temporal trends of childhood type 1 diabetes between 1975 and 2012 in Navarre (Spain). *Gac Sanit*. 2015;29(1):51-4.
120. Thomas NJ, Jones SE, Weedon MN, Shields BM, Oram RA, Hattersley AT. Frequency and phenotype of type 1 diabetes in the first six decades of life: a cross-sectional, genetically stratified survival analysis from UK Biobank. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2018;6(2):122-9.
121. Hope SV, Wienand-Barnett S, Shepherd M, King SM, Fox C, Khunti K, et al. Practical Classification Guidelines for Diabetes in patients treated with insulin: a

- cross-sectional study of the accuracy of diabetes diagnosis. *Br J Gen Pract.* 2016;66(646):e315-22.
122. Diaz-Valencia PA, Bougneres P, Valleron AJ. Global epidemiology of type 1 diabetes in young adults and adults: a systematic review. *BMC Public Health.* 2015;15:255.
123. Ostman J, Lonnberg G, Arnqvist HJ, Blohme G, Bolinder J, Ekblom Schnell A, et al. Gender differences and temporal variation in the incidence of type 1 diabetes: results of 8012 cases in the nationwide Diabetes Incidence Study in Sweden 1983-2002. *J Intern Med.* 2008;263(4):386-94.
124. Noble JA. Immunogenetics of type 1 diabetes: A comprehensive review. *Journal of autoimmunity.* 2015;64:101-12.
125. Knip M, Virtanen SM, Akerblom HK. Infant feeding and the risk of type 1 diabetes. *Am J Clin Nutr.* 2010;91(5):1506s-13s.
126. Boerner BP, Sarvetnick NE. Type 1 diabetes: role of intestinal microbiome in humans and mice. *Ann N Y Acad Sci.* 2011;1243:103-18.
127. Richardson SJ, Rodriguez-Calvo T, Gerling IC, Mathews CE, Kaddis JS, Russell MA, et al. Islet cell hyperexpression of HLA class I antigens: a defining feature in type 1 diabetes. *Diabetologia.* 2016;59(11):2448-58.
128. Haskins K, Cooke A. CD4 T cells and their antigens in the pathogenesis of autoimmune diabetes. *Current opinion in immunology.* 2011;23(6):739-45.
129. Lundberg M, Lindqvist A, Wierup N, Krogvold L, Dahl-Jorgensen K, Skog O. The density of parasympathetic axons is reduced in the exocrine pancreas of individuals recently diagnosed with type 1 diabetes. *PLoS one.* 2017;12(6):e0179911.
130. Akirav EM, Baquero MT, Opore-Addo LW, Akirav M, Galvan E, Kushner JA, et al. Glucose and inflammation control islet vascular density and beta-cell function in NOD mice: control of islet vasculature and vascular endothelial growth factor by glucose. *Diabetes.* 2011;60(3):876-83.
131. Nagy N, Kaber G, Johnson PY, Gebe JA, Preisinger A, Falk BA, et al. Inhibition of hyaluronan synthesis restores immune tolerance during autoimmune insulinitis. *The Journal of clinical investigation.* 2015;125(10):3928-40.
132. Taborsky GJ, Jr., Mei Q, Hackney DJ, Mundinger TO. The search for the mechanism of early sympathetic islet neuropathy in autoimmune diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 2014;16 Suppl 1:96-101.
133. Campbell-Thompson ML, Atkinson MA, Butler AE, Chapman NM, Frisk G, Gianani R, et al. The diagnosis of insulinitis in human type 1 diabetes. *Diabetologia.* 2013;56(11):2541-3.
134. Dabelea D, Rewers A, Stafford JM, Standiford DA, Lawrence JM, Saydah S, et al. Trends in the prevalence of ketoacidosis at diabetes diagnosis: the SEARCH for diabetes in youth study. *Pediatrics.* 2014;133(4):e938-45.
135. Nathan DM. The diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study at 30 years: overview. *Diabetes Care.* 2014;37(1):9-16.
136. Skyler JS. Hope vs hype: where are we in type 1 diabetes? *Diabetologia.* 2018;61(3):509-16.
137. Cantu-Rodriguez OG, Lavallo-Gonzalez F, Herrera-Rojas MA, Jaime-Perez JC, Hawing-Zarate JA, Gutierrez-Aguirre CH, et al. Long-Term Insulin Independence in Type 1 Diabetes Mellitus Using a Simplified Autologous Stem Cell Transplant. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2016;101(5):2141-8.
138. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnock GL, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *The New England journal of medicine.* 2000;343(4):230-8.

139. American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Diabetes Care*. 2018;41(Suppl 1):S13-s27.
140. Ziegler AG, Nepom GT. Prediction and pathogenesis in type 1 diabetes. *Immunity*. 2010;32(4):468-78.
141. Ziegler AG, Rewers M, Simell O, Simell T, Lempainen J, Steck A, et al. Seroconversion to multiple islet autoantibodies and risk of progression to diabetes in children. *Jama*. 2013;309(23):2473-9.
142. American Diabetes Association. 3. Comprehensive Medical Evaluation and Assessment of Comorbidities: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Diabetes Care*. 2018;41(Suppl 1):S28-s37.
143. Broedbaek K, Hilsted L. Chromogranin A as biomarker in diabetes. *Biomark Med*. 2016;10(11):1181-9.
144. O'Connor DT, Cadman PE, Smiley C, Salem RM, Rao F, Smith J, et al. Pancreastatin: multiple actions on human intermediary metabolism in vivo, variation in disease, and naturally occurring functional genetic polymorphism. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2005;90(9):5414-25.
145. Funakoshi A, Tateishi K, Shinozaki H, Matsumoto M, Wakasugi H. Elevated plasma levels of pancreastatin (PST) in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM). *Regulatory peptides*. 1990;30(2):159-64.
146. Tateishi K, Funakoshi A, Wakasugi H, Iguchi H, Shinozaki H, Abe M, et al. Plasma pancreastatin-like immunoreactivity in various diseases. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1989;69(6):1305-8.
147. Gayen JR, Saberi M, Schenk S, Biswas N, Vaingankar SM, Cheung WW, et al. A novel pathway of insulin sensitivity in chromogranin A null mice: a crucial role for pancreastatin in glucose homeostasis. *J Biol Chem*. 2009;284(42):28498-509.
148. Sanchez-Margalet V. Modulation of insulin receptor signalling by pancreastatin in HTC hepatoma cells. *Diabetologia*. 1999;42(3):317-25.
149. DiLorenzo TP. Multiple antigens versus single major antigen in type 1 diabetes: arguing for multiple antigens. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2011;27(8):778-83.
150. DeLong T, Baker RL, He J, Barbour G, Bradley B, Haskins K. Diabetogenic T-cell clones recognize an altered peptide of chromogranin A. *Diabetes*. 2012;61(12):3239-46.
151. Gottlieb PA, DeLong T, Baker RL, Fitzgerald-Miller L, Wagner R, Cook G, et al. Chromogranin A is a T cell antigen in human type 1 diabetes. *Journal of autoimmunity*. 2014;50:38-41.
152. Stadinski BD, DeLong T, Reisdorph N, Reisdorph R, Powell RL, Armstrong M, et al. Chromogranin A is an autoantigen in type 1 diabetes. *Nature immunology*. 2010;11(3):225-31.
153. Li Y, Zhou L, Li Y, Zhang J, Guo B, Meng G, et al. Identification of autoreactive CD8+ T cell responses targeting chromogranin A in humanized NOD mice and type 1 diabetes patients. *Clinical immunology*. 2015;159(1):63-71.
154. Kahaly GJ. Polyglandular autoimmune syndromes. *European journal of endocrinology*. 2009;161(1):11-20.
155. Maurer A, Schwarting A, Kahaly GJ. [Polyglandular autoimmune syndromes]. *Z Rheumatol*. 2011;70(9):752-4, 6-9.
156. Husebye ES, Perheentupa J, Rautemaa R, Kampe O. Clinical manifestations and management of patients with autoimmune polyendocrine syndrome type I. *J Intern Med*. 2009;265(5):514-29.
157. Hansen MP, Matheis N, Kahaly GJ. Type 1 diabetes and polyglandular autoimmune syndrome: A review. *World J Diabetes*. 2015;6(1):67-79.

158. Betterle C, Lazzarotto F, Presotto F. Autoimmune polyglandular syndrome Type 2: the tip of an iceberg? *Clinical and experimental immunology*. 2004;137(2):225-33.
159. Naletto L, Frigo A, Ceccato F, Sabbadin C, Scarpa R, Presotto F, et al. THE NATURAL HISTORY OF AUTOIMMUNE ADDISON'S DISEASE FROM THE DETECTION OF AUTOANTIBODIES TO DEVELOPMENT OF THE DISEASE: A LONG FOLLOW-UP STUDY ON 143 PATIENTS. *European journal of endocrinology*. 2019.
160. Ohsie S, Gerney G, Gui D, Kahana D, Martin MG, Cortina G. A paucity of colonic enteroendocrine and/or enterochromaffin cells characterizes a subset of patients with chronic unexplained diarrhea/malabsorption. *Hum Pathol*. 2009;40(7):1006-14.
161. Posovszky C, Lahr G, von Schnurbein J, Buderus S, Findeisen A, Schroder C, et al. Loss of enteroendocrine cells in autoimmune-polyendocrine-candidiasis-ectodermal-dystrophy (APECED) syndrome with gastrointestinal dysfunction. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012;97(2):E292-300.
162. Ekwall O, Hedstrand H, Grimelius L, Haavik J, Perheentupa J, Gustafsson J, et al. Identification of tryptophan hydroxylase as an intestinal autoantigen. *Lancet*. 1998;352(9124):279-83.
163. Scarpa R, Alaggio R, Norberto L, Furmaniak J, Chen S, Smith BR, et al. Tryptophan hydroxylase autoantibodies as markers of a distinct autoimmune gastrointestinal component of autoimmune polyendocrine syndrome type 1. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2013;98(2):704-12.
164. Kahaly GJ, Bartalena L, Hegedus L, Leenhardt L, Poppe K, Pearce SH. 2018 European Thyroid Association Guideline for the Management of Graves' Hyperthyroidism. *Eur Thyroid J*. 2018;7(4):167-86.
165. Smith TJ, Hegedus L. Graves' Disease. *The New England journal of medicine*. 2016;375(16):1552-65.
166. Inaba H, De Groot LJ, Akamizu T. Thyrotropin Receptor Epitope and Human Leukocyte Antigen in Graves' Disease. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2016;7:120.
167. Strieder TG, Prummel MF, Tijssen JG, Endert E, Wiersinga WM. Risk factors for and prevalence of thyroid disorders in a cross-sectional study among healthy female relatives of patients with autoimmune thyroid disease. *Clinical endocrinology*. 2003;59(3):396-401.
168. Effraimidis G, Wiersinga WM. Mechanisms in endocrinology: autoimmune thyroid disease: old and new players. *European journal of endocrinology*. 2014;170(6):R241-52.
169. Morshed SA, Latif R, Davies TF. Characterization of thyrotropin receptor antibody-induced signaling cascades. *Endocrinology*. 2009;150(1):519-29.
170. Burch HB, Cooper DS. Management of Graves Disease: A Review. *Jama*. 2015;314(23):2544-54.
171. Grebe SK, Kahaly GJ. Laboratory testing in hyperthyroidism. *The American journal of medicine*. 2012;125(9):S2.
172. Tozzoli R, Bagnasco M, Giavarina D, Bizzaro N. TSH receptor autoantibody immunoassay in patients with Graves' disease: improvement of diagnostic accuracy over different generations of methods. Systematic review and meta-analysis. *Autoimmunity reviews*. 2012;12(2):107-13.
173. Al-Shoumer KA, Vasanthi BA. Serum chromogranin A concentration in hyperthyroidism before and after medical treatment. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2009;94(7):2321-4.
174. Ajjan RA, Weetman AP. The Pathogenesis of Hashimoto's Thyroiditis: Further Developments in our Understanding. *Horm Metab Res*. 2015;47(10):702-10.

175. Vanderpump MP. The epidemiology of thyroid disease. *Br Med Bull.* 2011;99:39-51.
176. McLeod DS, Caturegli P, Cooper DS, Matos PG, Hutfless S. Variation in rates of autoimmune thyroid disease by race/ethnicity in US military personnel. *Jama.* 2014;311(15):1563-5.
177. Hollowell JG, Staehling NW, Flanders WD, Hannon WH, Gunter EW, Spencer CA, et al. Serum TSH, T(4), and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2002;87(2):489-99.
178. Kahaly GJ, Diana T, Glang J, Kanitz M, Pitz S, Konig J. Thyroid Stimulating Antibodies Are Highly Prevalent in Hashimoto's Thyroiditis and Associated Orbitopathy. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2016;101(5):1998-2004.
179. Wiersinga WM. Thyroid hormone replacement therapy. *Horm Res.* 2001;56 Suppl 1:74-81.
180. Hutfless S, Matos P, Talor MV, Caturegli P, Rose NR. Significance of prediagnostic thyroid antibodies in women with autoimmune thyroid disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2011;96(9):E1466-71.
181. Pandit AA, Vijay Warde M, Menon PS. Correlation of number of intrathyroid lymphocytes with antimicrosomal antibody titer in Hashimoto's thyroiditis. *Diagn Cytopathol.* 2003;28(2):63-5.
182. Wasniewska M, Corrias A, Salerno M, Lombardo F, Aversa T, Mussa A, et al. Outcomes of children with hashitoxicosis. *Hormone research in paediatrics.* 2012;77(1):36-40.
183. Polikar R, Kennedy B, Ziegler M, O'Connor DT, Smith J, Nicod P. Plasma norepinephrine kinetics, dopamine-beta-hydroxylase, and chromogranin-A, in hypothyroid patients before and following replacement therapy. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 1990;70(1):277-81.
184. Alexandraki KI, Nikolaou A, Thomas D, Syriou V, Korkolopoulou P, Sougioultzis S, et al. Are patients with autoimmune thyroid disease and autoimmune gastritis at risk of gastric neuroendocrine neoplasms type 1? *Clinical endocrinology.* 2014;80(5):685-90.
185. Checchi S, Montanaro A, Ciuli C, Brusco L, Pasqui L, Fioravanti C, et al. Prevalence of parietal cell antibodies in a large cohort of patients with autoimmune thyroiditis. *Thyroid.* 2010;20(12):1385-9.
186. Nikolaou A, Thomas D, Alexandraki KI, Sougioultzis S, Tsolakis AV, Kaltsas G. Predictive value of gastrin levels for the diagnosis of gastric enterochromaffin-like cell hyperplasia in patients with Hashimoto's thyroiditis. *Neuroendocrinology.* 2014;99(2):118-22.
187. Arlt W, Allolio B. Adrenal insufficiency. *Lancet.* 2003;361(9372):1881-93.
188. Barthel A, Benker G, Berens K, Diederich S, Manfras B, Gruber M, et al. An Update on Addison's Disease. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2019;127(2-03):165-75.
189. Meyer G, Neumann K, Badenhop K, Linder R. Increasing prevalence of Addison's disease in German females: health insurance data 2008-2012. *European journal of endocrinology.* 2014;170(3):367-73.
190. Charmandari E, Nicolaides NC, Chrousos GP. Adrenal insufficiency. *Lancet.* 2014;383(9935):2152-67.
191. Allolio B. Extensive expertise in endocrinology. Adrenal crisis. *European journal of endocrinology.* 2015;172(3):R115-24.
192. Bornstein SR, Allolio B, Arlt W, Barthel A, Don-Wauchope A, Hammer GD, et al. Diagnosis and Treatment of Primary Adrenal Insufficiency: An Endocrine Society

- Clinical Practice Guideline. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2016;101(2):364-89.
193. Betterle C, Morlin L. Autoimmune Addison's disease. *Endocr Dev*. 2011;20:161-72.
194. El Ali Z, Fichna M, Piniewska J, Kosowicz J, Grzymislowski M. Chromogranin A as a useful neuroendocrine marker in patients with autoimmune Addison's disease. *Journal of endocrinological investigation*. 2010;33(3):186-91.
195. Park JY, Lam-Himlin D, Vemulapalli R. Review of autoimmune metaplastic atrophic gastritis. *Gastrointestinal endoscopy*. 2013;77(2):284-92.
196. Kulnigg-Dabsch S. Autoimmune gastritis. *Wien Med Wochenschr*. 2016;166(13-14):424-30.
197. Andres E, Serraj K. Optimal management of pernicious anemia. *J Blood Med*. 2012;3:97-103.
198. Carmel R. Prevalence of undiagnosed pernicious anemia in the elderly. *Archives of internal medicine*. 1996;156(10):1097-100.
199. Veijola LI, Oksanen AM, Sipponen PI, Rautelin HI. Association of autoimmune type atrophic corpus gastritis with *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol*. 2010;16(1):83-8.
200. Toh BH. Diagnosis and classification of autoimmune gastritis. *Autoimmunity reviews*. 2014;13(4-5):459-62.
201. Bergman MP, D'Elis MM. Cytotoxic T cells in *H. pylori*-related gastric autoimmunity and gastric lymphoma. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:104918.
202. Amedei A, Bergman MP, Appelmelk BJ, Azzurri A, Benagiano M, Tamburini C, et al. Molecular mimicry between *Helicobacter pylori* antigens and H⁺, K⁺ -- adenosine triphosphatase in human gastric autoimmunity. *J Exp Med*. 2003;198(8):1147-56.
203. Negrini R, Savio A, Poiesi C, Appelmelk BJ, Buffoli F, Paterlini A, et al. Antigenic mimicry between *Helicobacter pylori* and gastric mucosa in the pathogenesis of body atrophic gastritis. *Gastroenterology*. 1996;111(3):655-65.
204. Callaghan JM, Khan MA, Alderuccio F, van Driel IR, Gleeson PA, Toh BH. Alpha and beta subunits of the gastric H⁺/K⁽⁺⁾-ATPase are concordantly targeted by parietal cell autoantibodies associated with autoimmune gastritis. *Autoimmunity*. 1993;16(4):289-95.
205. Cockburn AN, Morgan CJ, Genta RM. Neuroendocrine proliferations of the stomach: a pragmatic approach for the perplexed pathologist. *Adv Anat Pathol*. 2013;20(3):148-57.
206. Walsh JH. Role of gastrin as a trophic hormone. *Digestion*. 1990;47 Suppl 1:11-6; discussion 49-52.
207. Hershko C, Ronson A, Souroujon M, Maschler I, Heyd J, Patz J. Variable hematologic presentation of autoimmune gastritis: age-related progression from iron deficiency to cobalamin depletion. *Blood*. 2006;107(4):1673-9.
208. Hershko C, Hoffbrand AV, Keret D, Souroujon M, Maschler I, Monselise Y, et al. Role of autoimmune gastritis, *Helicobacter pylori* and celiac disease in refractory or unexplained iron deficiency anemia. *Haematologica*. 2005;90(5):585-95.
209. Annibale B, Capurso G, Chistolini A, D'Ambra G, DiGiulio E, Monarca B, et al. Gastrointestinal causes of refractory iron deficiency anemia in patients without gastrointestinal symptoms. *The American journal of medicine*. 2001;111(6):439-45.
210. Goncalves C, Oliveira ME, Palha AM, Ferrao A, Morais A, Lopes AI. Autoimmune gastritis presenting as iron deficiency anemia in childhood. *World J Gastroenterol*. 2014;20(42):15780-6.
211. Kaye PV, Garsed K, Ragunath K, Jawhari A, Pick B, Atherton JC. The clinical utility and diagnostic yield of routine gastric biopsies in the investigation of iron

- deficiency anemia: a case-control study. *The American journal of gastroenterology*. 2008;103(11):2883-9.
212. Dickey W, Kenny BD, McMillan SA, Porter KG, McConnell JB. Gastric as well as duodenal biopsies may be useful in the investigation of iron deficiency anaemia. *Scand J Gastroenterol*. 1997;32(5):469-72.
213. Annibale B, Capurso G, Delle Fave G. The stomach and iron deficiency anaemia: a forgotten link. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*. 2003;35(4):288-95.
214. Vannella L, Lahner E, Osborn J, Annibale B. Systematic review: gastric cancer incidence in pernicious anaemia. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2013;37(4):375-82.
215. Vannella L, Sbrozzi-Vanni A, Lahner E, Bordi C, Pillozzi E, Corleto VD, et al. Development of type I gastric carcinoid in patients with chronic atrophic gastritis. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2011;33(12):1361-9.
216. Dinis-Ribeiro M, Areia M, de Vries AC, Marcos-Pinto R, Monteiro-Soares M, O'Connor A, et al. Management of precancerous conditions and lesions in the stomach (MAPS): guideline from the European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE), European Helicobacter Study Group (EHSO), European Society of Pathology (ESP), and the Sociedade Portuguesa de Endoscopia Digestiva (SPED). *Endoscopy*. 2012;44(1):74-94.
217. Faller G, Winter M, Steininger H, Lehn N, Meining A, Bayerdorffer E, et al. Decrease of antigastric autoantibodies in *Helicobacter pylori* gastritis after cure of infection. *Pathol Res Pract*. 1999;195(4):243-6.
218. Miceli E, Lenti MV, Padula D, Luinetti O, Vattiato C, Monti CM, et al. Common features of patients with autoimmune atrophic gastritis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2012;10(7):812-4.
219. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *The American journal of surgical pathology*. 1996;20(10):1161-81.
220. Park YH, Kim N. Review of atrophic gastritis and intestinal metaplasia as a premalignant lesion of gastric cancer. *J Cancer Prev*. 2015;20(1):25-40.
221. Coati I, Fassan M, Farinati F, Graham DY, Genta RM, Rugge M. Autoimmune gastritis: Pathologist's viewpoint. *World J Gastroenterol*. 2015;21(42):12179-89.
222. Tozzoli R, Kodermaz G, Perosa AR, Tampoia M, Zucano A, Antico A, et al. Autoantibodies to parietal cells as predictors of atrophic body gastritis: a five-year prospective study in patients with autoimmune thyroid diseases. *Autoimmunity reviews*. 2010;10(2):80-3.
223. Lahner E, Norman GL, Severi C, Encabo S, Shums Z, Vannella L, et al. Reassessment of intrinsic factor and parietal cell autoantibodies in atrophic gastritis with respect to cobalamin deficiency. *The American journal of gastroenterology*. 2009;104(8):2071-9.
224. Antico A, Tampoia M, Villalta D, Tonutti E, Tozzoli R, Bizzaro N. Clinical usefulness of the serological gastric biopsy for the diagnosis of chronic autoimmune gastritis. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:520970.
225. Redaktion P. ECL-Zellen [Webpage]. *Psychrembel online*; [updated 12.2016; cited 18.11.2019 18.11.2019 08:48]. Available from: <https://www.psychrembel.de/ECL-Zellen/K0031>.
226. Kleveland O, Syversen U, Slordahl K, Waldum HL. Hypergastrinemia as a cause of chromogranin a increase in blood in patients suspected to have neuroendocrine tumor. *Digestion*. 2001;64(2):71-4.

227. Kalkan C, Karakaya F, Soykan I. Factors associated with elevated serum chromogranin A levels in patients with autoimmune gastritis. *Turk J Gastroenterol.* 2016;27(6):515-20.
228. Hakanson R, Ding XQ, Norlen P, Chen D. Circulating pancreastatin is a marker for the enterochromaffin-like cells of the rat stomach. *Gastroenterology.* 1995;108(5):1445-52.
229. Peracchi M, Conte D, Gebbia C, Penati C, Pizzinelli S, Arosio M, et al. Plasma chromogranin A in patients with sporadic gastro-entero-pancreatic neuroendocrine tumors or multiple endocrine neoplasia type 1. *European journal of endocrinology.* 2003;148(1):39-43.
230. Syversen U, Mignon M, Bonfils S, Kristensen A, Waldum HL. Chromogranin A and pancreastatin-like immunoreactivity in serum of gastrinoma patients. *Acta Oncol.* 1993;32(2):161-5.
231. Stabile BE, Howard TJ, Passaro E, Jr., O'Connor DT. Source of plasma chromogranin A elevation in gastrinoma patients. *Arch Surg.* 1990;125(4):451-3.
232. Rampertab SD, Pooran N, Brar P, Singh P, Green PH. Trends in the presentation of celiac disease. *The American journal of medicine.* 2006;119(4):355.e9-14.
233. Marild K, Ye W, Lebwohl B, Green PH, Blaser MJ, Card T, et al. Antibiotic exposure and the development of coeliac disease: a nationwide case-control study. *BMC Gastroenterol.* 2013;13:109.
234. Petronzelli F, Bonamico M, Ferrante P, Grillo R, Mora B, Mariani P, et al. Genetic contribution of the HLA region to the familial clustering of coeliac disease. *Ann Hum Genet.* 1997;61(Pt 4):307-17.
235. Stene LC, Honeyman MC, Hoffenberg EJ, Haas JE, Sokol RJ, Emery L, et al. Rotavirus infection frequency and risk of celiac disease autoimmunity in early childhood: a longitudinal study. *The American journal of gastroenterology.* 2006;101(10):2333-40.
236. Stein J, Schuppan D. Coeliac Disease - New Pathophysiological Findings and Their Implications for Therapy. *Viszeralmedizin.* 2014;30(3):156-65.
237. Qiao SW, Bergseng E, Molberg O, Xia J, Fleckenstein B, Khosla C, et al. Antigen presentation to celiac lesion-derived T cells of a 33-mer gliadin peptide naturally formed by gastrointestinal digestion. *J Immunol.* 2004;173(3):1757-62.
238. Schuppan D, Zimmer KP. The diagnosis and treatment of celiac disease. *Dtsch Arztebl Int.* 2013;110(49):835-46.
239. Felber J, Aust D, Baas S, Bischoff S, Blaker H, Daum S, et al. [Results of a S2k-Consensus Conference of the German Society of Gastroenterology, Digestive- and Metabolic Diseases (DGVS) in conjunction with the German Coeliac Society (DZG) regarding coeliac disease, wheat allergy and wheat sensitivity]. *Z Gastroenterol.* 2014;52(7):711-43.
240. Kahaly GJ, Schuppan D. Celiac disease and endocrine autoimmunity. *Dig Dis.* 2015;33(2):155-61.
241. Ventura A, Magazzu G, Greco L. Duration of exposure to gluten and risk for autoimmune disorders in patients with celiac disease. *SIGEP Study Group for Autoimmune Disorders in Celiac Disease. Gastroenterology.* 1999;117(2):297-303.
242. Malamut G, Meresse B, Cellier C, Cerf-Bensussan N. Refractory celiac disease: from bench to bedside. *Semin Immunopathol.* 2012;34(4):601-13.
243. van Gils T, Nijeboer P, van Wanrooij RL, Bouma G, Mulder CJ. Mechanisms and management of refractory coeliac disease. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology.* 2015;12(10):572-9.

244. Al-Toma A, Verbeek WH, Hadithi M, von Blomberg BM, Mulder CJ. Survival in refractory coeliac disease and enteropathy-associated T-cell lymphoma: retrospective evaluation of single-centre experience. *Gut*. 2007;56(10):1373-8.
245. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabo IR, Mearin ML, Phillips A, Shamir R, et al. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2012;54(1):136-60.
246. Pietroletti R, Bishop AE, Carlei F, Bonamico M, Lloyd RV, Wilson BS, et al. Gut endocrine cell population in coeliac disease estimated by immunocytochemistry using a monoclonal antibody to chromogranin. *Gut*. 1986;27(7):838-43.
247. Moyana TN, Shukoor S. Gastrointestinal endocrine cell hyperplasia in celiac disease: a selective proliferative process of serotonergic cells. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 1991;4(4):419-23.
248. Coleman NS, Foley S, Dunlop SP, Wheatcroft J, Blackshaw E, Perkins AC, et al. Abnormalities of serotonin metabolism and their relation to symptoms in untreated coeliac disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2006;4(7):874-81.
249. Sjolund K, Alumets J, Berg NO, Hakanson R, Sundler F. Enteropathy of coeliac disease in adults: increased number of enterochromaffin cells the duodenal mucosa. *Gut*. 1982;23(1):42-8.
250. Buchan AM, Grant S, Brown JC, Freeman HJ. A quantitative study of enteric endocrine cells in celiac sprue. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1984;3(5):665-71.
251. Enerback L, Hallert C, Norrby K. Raised 5-hydroxytryptamine concentrations in enterochromaffin cells in adult coeliac disease. *J Clin Pathol*. 1983;36(5):499-503.
252. Di Sabatino A, Giuffrida P, Vanoli A, Luinetti O, Manca R, Biancheri P, et al. Increase in neuroendocrine cells in the duodenal mucosa of patients with refractory coeliac disease. *The American journal of gastroenterology*. 2014;109(2):258-69.
253. Ponto KA, Schuppan D, Zwiener I, Binder H, Mirshahi A, Diana T, et al. Thyroid-associated orbitopathy is linked to gastrointestinal autoimmunity. *Clinical and experimental immunology*. 2014;178(1):57-64.
254. Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin -Zentrallabor-. Analytinformaion: Gastrin: Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin,; [updated 07.03.2011; cited 08.08.2019. Available from: http://www.unimedizin-mainz.de/index.php?id=16083&no_cache=1&analytxx=3277.
255. EUROIMMUN AG. EUROPLUS Magen (Affe) / Intrinsic Faktor 12/2013 ed. Lübeck: EUROIMMUN AG; 2013
256. Thermo Fisher Scientific BRAHMS GmbH. BRAHMS KRYPTOR compact PLUS Produktbeschreibung. Henningsdorf: Thermo Fisher Scientific BRAHMS GmbH; 2014.
257. Thermo Fisher Scientific BRAHMS GmbH. BRAHMS KRYPTOR compact PLUS Thermo Fisher Scientific BRAHMS GmbH; [cited 20.12.2016. Available from: <http://www.brahms-instruments.com/kryptor-compact-plus.html>.
258. Thermo Fisher Scientific BRAHMS GmbH. Thermo Scientific BRAHMS CgA II KRYPTOR user manual german. Henningsdorf: Thermo Fisher Scientific BRAHMS GmbH; 2014.
259. Thermo Fisher Scientific BRAHMS GmbH. Thermo Scientific BRAHMS KRYPTOR compact PLUS user manual german Version 6. Henningsdorf: Thermo Fisher Scientific BRAHMS GmbH; 2013.
260. Customer Service BRAHMS GmbH. BRAHMS Biomarkers TRACE Technologie. 2010.

261. Thermo Fisher Scientific BRAHMS GmbH. TRACE - Technologie: Thermo Fisher Scientific BRAHMS GmbH; [cited 09.08.2019. Available from: <https://www.brahms-instruments.com/de/technology/trace-technologie.html>.
262. Thermo Fisher Scientific BRAHMS GmbH. Thermo Scientific BRAHMS CgA II Kryptor Hennigsdorf: Thermo Fisher Scientific BRAHMS GmbH; 2014.
263. Hsu JC. Multiple Comparisons: Theory and Methods. London: Chapman & Hall; 1996.
264. Schumacher M, Schulgen G. Methodik klinischer Studien 3. Auflage. 3. Auflage ed. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag 2008. p. 330-6.
265. Sanduleanu S, De Bruine A, Stridsberg M, Jonkers D, Biemond I, Hameeteman W, et al. Serum chromogranin A as a screening test for gastric enterochromaffin-like cell hyperplasia during acid-suppressive therapy. *Eur J Clin Invest.* 2001;31(9):802-11.
266. De Block CE, Colpin G, Thielemans K, Coopmans W, Bogers JJ, Pelckmans PA, et al. Neuroendocrine tumor markers and enterochromaffin-like cell hyper/dysplasia in type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 2004;27(6):1387-93.
267. Curry WJ, Shaw C, Johnston CF, Thim L, Buchanan KD. Isolation and primary structure of a novel chromogranin A-derived peptide, WE-14, from a human midgut carcinoid tumour. *FEBS Lett.* 1992;301(3):319-21.
268. Cetin Y, Aunis D, Bader MF, Galindo E, Jorns A, Bargsten G, et al. Chromostatin, a chromogranin A-derived bioactive peptide, is present in human pancreatic insulin (beta) cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(6):2360-4.
269. Hughes JW, Riddlesworth TD, DiMeglio LA, Miller KM, Rickels MR, McGill JB. Autoimmune Diseases in Children and Adults With Type 1 Diabetes From the T1D Exchange Clinic Registry. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2016;101(12):4931-7.
270. De Block CE, De Leeuw IH, Van Gaal LF. Autoimmune gastritis in type 1 diabetes: a clinically oriented review. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2008;93(2):363-71.
271. De Block CE, De Leeuw IH, Van Gaal LF. High prevalence of manifestations of gastric autoimmunity in parietal cell antibody-positive type 1 (insulin-dependent) diabetic patients. The Belgian Diabetes Registry. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 1999;84(11):4062-7.
272. De Block CE, De Leeuw IH, Rooman RP, Winnock F, Du Caju MV, Van Gaal LF. Gastric parietal cell antibodies are associated with glutamic acid decarboxylase-65 antibodies and the HLA DQA1*0501-DQB1*0301 haplotype in Type 1 diabetes mellitus. Belgian Diabetes Registry. *Diabet Med.* 2000;17(8):618-22.
273. Burggraaf J, Tulen JH, Lalezari S, Schoemaker RC, De Meyer PH, Meinders AE, et al. Sympathovagal imbalance in hyperthyroidism. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001;281(1):E190-5.
274. Chen JL, Chiu HW, Tseng YJ, Chu WC. Hyperthyroidism is characterized by both increased sympathetic and decreased vagal modulation of heart rate: evidence from spectral analysis of heart rate variability. *Clinical endocrinology.* 2006;64(6):611-6.
275. Bornstein SR, Breidert M, Ehrhart-Bornstein M, Kloos B, Scherbaum WA. Plasma catecholamines in patients with Addison's disease. *Clinical endocrinology.* 1995;42(2):215-8.
276. Khan WI, Ghia JE. Gut hormones: emerging role in immune activation and inflammation. *Clinical and experimental immunology.* 2010;161(1):19-27.
277. Rindi G, Leiter AB, Kopin AS, Bordi C, Solcia E. The "normal" endocrine cell of the gut: changing concepts and new evidences. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1014:1-12.

278. Facer P, Bishop AE, Lloyd RV, Wilson BS, Hennessy RJ, Polak JM. Chromogranin: a newly recognized marker for endocrine cells of the human gastrointestinal tract. *Gastroenterology*. 1985;89(6):1366-73.
279. Anouar Y, Benie T, De Monti M, Counis R, Duval J. Estradiol negatively regulates secretogranin II and chromogranin A messenger ribonucleic acid levels in the female rat pituitary but not in the adrenal. *Endocrinology*. 1991;129(5):2393-9.
280. Anouar Y, Duval J. Direct estradiol down-regulation of secretogranin II and chromogranin A mRNA levels in rat pituitary cells. *Mol Cell Endocrinol*. 1992;88(1-3):97-104.
281. Anouar Y, Monti M, Galindo E, Benie T, Aunis D, Duval J. Regulatory Effects of Estrogens on the Pituitary Content of Secretogranin II and Chromogranin A. *J Neuroendocrinol*. 1991;3(3):233-5.
282. Fossmark R, Jianu CS, Martinsen TC, Qvigstad G, Syversen U, Waldum HL. Serum gastrin and chromogranin A levels in patients with fundic gland polyps caused by long-term proton-pump inhibition. *Scand J Gastroenterol*. 2008;43(1):20-4.
283. Waldum HL, Arnestad JS, Brenna E, Eide I, Syversen U, Sandvik AK. Marked increase in gastric acid secretory capacity after omeprazole treatment. *Gut*. 1996;39(5):649-53.
284. Bioassays C. CGA-RIACT. 2018.
285. Igaz P, Mullner K, Hargitai B, Igaz I, Tombol Z, Racz K, et al. Marked chromogranin A elevation in a patient with bilateral adrenal incidentalomas, and its rapid normalization after discontinuation of proton pump inhibitor therapy. *Clinical endocrinology*. 2007;67(5):805-6.
286. Lahner E, Centanni M, Agnello G, Gargano L, Vannella L, Iannoni C, et al. Occurrence and risk factors for autoimmune thyroid disease in patients with atrophic body gastritis. *The American journal of medicine*. 2008;121(2):136-41.
287. Helle KB, Corti A, Metz-Boutigue MH, Tota B. The endocrine role for chromogranin A: a prohormone for peptides with regulatory properties. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2007;64(22):2863-86.

Danksagung

Tabellarischer Lebenslauf