

Kurzbericht

„Microbiome-gut-brain Interaction in Anorexia Nervosa (MiGBAN)“

Förderkennzeichen: 01EW1906B

Gruppenleiter: Prof. Dr. rer. nat. John Baines / Prof. Astrid Dempfle

Institut für Experimentelle Medizin, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel & Max-Planck-Institut für Evolutionsbiologie Plön / Institut für Medizinische Informatik und Statistik, Universität Kiel, Deutschland.

1. Ursprüngliche Aufgabenstellung + wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Anorexia nervosa (AN) ist eine der häufigsten chronischen Erkrankungen im Jugendalter mit einer hohen Sterblichkeitsrate und schweren gesundheitlichen Langzeitfolgen. Trotz eines multimodalen Behandlungskonzepts, das den Goldstandard der Behandlung darstellt, ist die Therapie nur teilweise wirksam, und Studien dokumentieren hohe Chronifizierungs- und Rückfallraten. Dies unterstreicht den dringenden Bedarf, die zugrunde liegende Pathophysiologie zu untersuchen und neue therapeutische Optionen zu finden, um die Behandlung von AN zu verbessern.

Zum Zeitpunkt des Projektbeginns gab es bereits zahlreiche Forschungsergebnisse zur Mikrobiota-Darm-Gehirn-Achse, die auf eine komplexe Wechselwirkung zwischen dem Darmmikrobiom und dem Gehirn über verschiedene neuronale, endokrine und immunologische Wege hinwiesen. Obwohl erste Erkenntnisse zur Mikrobiota-Darm-Gehirn-Achse bei AN vorlagen, gab es im Vergleich zu anderen Erkrankungen relativ wenige und sehr heterogene Ergebnisse. Zudem standen zum Projektbeginn keine Längsschnittdaten zur Verfügung, die langfristige Veränderungen im Mikrobiom nach Gewichtszunahme oder Rückfall dokumentierten. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Rolle des Darmmikrobioms bei der Regulation des Körpergewichts, das bei AN von besonderem Interesse ist. In diesem Zusammenhang sind Transplantationsstudien an keimfreien Tiermodellen besonders relevant.

2. Ablauf des Vorhabens

Das MiGBAN-Projekt umfasste eine Vielzahl von Arbeitspaketen, die sowohl Beobachtungs- als auch Interventionsstudien beinhalteten. Das Hauptziel des WP4 Z-Projekts war die Analyse des Darmmikrobioms bei AN-Patientinnen, gesunden Kontrollpersonen (HCs) und Tiermodellen. In den Studienzentren Aachen, Wien und Utrecht wurden über 200 AN-Patientinnen und HCs rekrutiert, die in Kiel mittels Shotgun-Metagenom-Sequenzierung untersucht wurden, um mikrobielle Signaturen zu identifizieren und deren funktionelle Charakterisierung durchzuführen. Zusätzlich wurde eine longitudinale Studie am Standort Aachen mit 60 Patienten und 34 HCs durchgeführt, die über ein Jahr hinweg an neun Zeitpunkten untersucht wurden. Diese Untersuchungen umfassten sowohl die 16S-rRNA-Gen-Sequenzierung als auch die Shotgun-Metagenom-Sequenzierung zu verschiedenen Zeitpunkten (Aufnahme, Entlassung, 12 Monate nach Aufnahme).

Parallel dazu wurden zwei randomisierte kontrollierte Studien (RCTs) durchgeführt: eine in Aachen zur Untersuchung der Wirkung von Omega-3-Fettsäuren (PUFA) und eine in Wien und Innsbruck zur Untersuchung der Wirkung von Probiotika auf das Darmmikrobiom und den Krankheitsverlauf. Diese Studien wurden intensiv geplant, einschließlich der Entwicklung detaillierter Studienprotokolle,

Erhebungsbögen und der stratifizierten Blockrandomisierung. Die Patienten wurden über sechs Monate hinweg behandelt und insgesamt ein Jahr lang nachbeobachtet.

Herausforderungen und Verzögerungen traten aufgrund der komplexen Planung und Umsetzung des Forschungsprojekts innerhalb des internationalen Konsortiums auf. Die praktischen Umsetzungen der Studien waren aufgrund unterschiedlicher nationaler regulatorischer Richtlinien und Gesetze zeitaufwendig. Zudem wurden sowohl die humanen als auch die Studien mit Tiermodellen durch COVID-19-bedingte Einschränkungen beeinflusst, was zu Verzögerungen bei der Rekrutierung und Durchführung führte. Trotz dieser Herausforderungen wurden alle Projektteile schließlich erfolgreich umgesetzt und die Daten systematisch erfasst und ausgewertet. Weitere Publikationen sind in Vorbereitung.

3. Wesentliche Ergebnisse + ggf. Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen

Das MiGBAN-Projekt hat wichtige Fortschritte bei der Identifizierung mikrobieller Biomarker gebracht, die mit dem klinischen Verlauf von AN assoziiert sind. Beispielsweise zeigte eine höhere Abundanz von *Sutterella* bei stationärer Aufnahme eine Assoziation mit einem höheren Körpergewicht ein Jahr nach Aufnahme. Die longitudinalen Analysen ergaben, dass Veränderungen im Darmmikrobiom auch nach einer Gewichtszunahme bei AN-Patienten bestehen bleiben, was auf eine langfristige Beeinflussung des Mikrobioms hinweist.

Weitere Analysen zeigten, dass bestimmte mikrobielle Taxa, die bei der Aufnahme vorhanden waren, prognostisch relevant für die Behandlungsdauer und den BMI nach einem Jahr sind. Diese Ergebnisse tragen dazu bei, ein besseres Verständnis der Mikrobiota-Darm-Gehirn-Achse und ihrer Rolle bei AN zu entwickeln und bieten potenzielle Ansatzpunkte für neue therapeutische Strategien.

Die Zusammenarbeit innerhalb des Konsortiums, das Forschende aus den Bereichen Psychiatrie, Neurowissenschaften, Mikrobiomforschung und Statistik umfasste, war entscheidend für den Erfolg des Projekts. Der Austausch von Wissen und die Nutzung der Sequenzierungseinrichtungen des Max-Planck-Instituts für Evolutionsbiologie in Plön beschleunigten die Datengenerierung und ermöglichten eine umfassende Analyse. Mehrere wissenschaftliche Publikationen, darunter Arbeiten in renommierten Zeitschriften wie „*Gut Microbes*“ und „*Neuroendocrinology*“, wurden bereits veröffentlicht und weitere sind in Vorbereitung, um die Erkenntnisse des Projekts der wissenschaftlichen Gemeinschaft zugänglich zu machen.

Dieses Projekt hat wichtige Erkenntnisse zur Rolle des Darmmikrobioms bei Anorexia nervosa geliefert und zeigt das Potenzial auf, neue therapeutische Ansätze zu entwickeln, die auf mikrobiellen Biomarkern basieren.

Erfolgskontrollbericht

„Microbiome-gut-brain Interaction in Anorexia Nervosa (MiGBAN)“

Förderkennzeichen: 01EW1906B

Gruppenleiter: Prof. Dr. rer. nat. John Baines / Prof. Astrid Dempfle

Institut für Experimentelle Medizin, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel & Max-Planck-Institut für Evolutionsbiologie Plön / Institut für Medizinische Informatik und Statistik, Universität Kiel, Deutschland.

Ursprüngliche Aufgabenstellung + wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Anorexia nervosa (AN) ist eine der häufigsten chronischen Erkrankungen im Jugendalter mit einer hohen Sterblichkeitsrate. Trotz eines multimodalen Behandlungskonzepts, das den Goldstandard der Therapie darstellt, ist die Behandlung nur teilweise erfolgreich und Studien dokumentieren hohe Chronifizierungs- und Rückfallraten (Dobrescu et al. 2020). Dies unterstreicht den enormen Bedarf, die zugrunde liegende Pathophysiologie zu untersuchen und neue therapeutische Optionen zu finden, um die Behandlung von AN zu ergänzen.

Bis heute liegen zahlreiche Forschungsergebnisse zur Mikrobiota-Darm-Gehirn-Achse vor, die eine Interaktion zwischen dem Darmmikrobiom und dem Gehirn über verschiedene neuronale, endokrine und immunologische Wege identifiziert haben (siehe (Cryan et al. 2019; Kelly et al. 2015) für einen Überblick). Obwohl erste Erkenntnisse zur Mikrobiota-Darm-Gehirn-Achse bei AN zu Projektbeginn bereits vorlagen, gab es nur wenige Ergebnisse im Vergleich zu anderen Krankheitsbildern, und diese waren sehr heterogen (siehe (Seitz, Trinh, and Herpertz-Dahlmann 2019), für einen Überblick). Zudem standen zum Zeitpunkt des Projektbeginns keine Längsschnittdaten nach der Entlassung aus stationärer Behandlung zur Verfügung, was das Verständnis der langfristigen Veränderungen im Mikrobiom nach Gewichtszunahme oder Rückfall erschwerte.

Darüber hinaus gibt es starke Hinweise darauf, dass das Darmmikrobiom auch allgemein an der Regulation des Körpergewichts beteiligt ist, was bei AN von besonderem Interesse sein könnte. In diesem Zusammenhang sind Transplantationsstudien an Tiermodellen besonders relevant, bei denen Stuhl in keimfreie Tiere transplantiert wird.

Ziel des WP4 Z-Projekts (Mikrobiomanalyse und Datenintegration)

Die Hauptziele des WP4 Z-Projekts waren:

- i) Analyse des Darmmikrobioms im Verlauf von Beobachtungs- und Interventionsstudien (Interventionen mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren bzw. Probiotika) bei jugendlichen Patientinnen mit AN, gesunden Kontrollpersonen (HCs; nur Beobachtungsstudien) und Tiermodellen;
- ii) Analyse der randomisierten kontrollierten Studien (RCTs) in Bezug auf relevante klinische Endpunkte im Vergleich der randomisierten Interventionsarme; und
- iii) Unterstützung aller Mitglieder des Konsortiums bei der statistischen Analyse der Daten und bei der angemessenen Integration der Daten.

Aufgrund der unterstützenden Rolle des WP4 Z-Projekts waren die Hauptziele der einzelnen Teilprojekte:

WP 1.1: Untersuchung der Unterschiede im Mikrobiom zwischen kurzzeitig erkrankten Jugendlichen mit AN und Patientinnen, deren Krankheit im Jugendalter begann und die über einen Zeitraum von mindestens 5 Jahren erkrankt waren;

WP 1.2: Untersuchung der klinischen Wirksamkeit der Verabreichung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA; Docosahexaensäure (DHA)/Eicosapentaensäure (EPA)) über 6 Monate bei hospitalisierten Jugendlichen mit AN im Vergleich zu Placebo und der Wirkung der Verabreichung auf das Darmmikrobiom auch im Vergleich zu HCs;

WP 1.3: Untersuchung der klinischen Wirksamkeit der Verabreichung von Probiotika über 6 Monate bei hospitalisierten Jugendlichen mit AN im Vergleich zu Placebo und der Wirkung der Verabreichung auf das Darmmikrobiom auch im Vergleich zu HCs;

WP 2.1: Vertiefung des Verständnisses der zugrunde liegenden Pathophysiologie der Darm-Gehirn-Interaktion mit Hilfe eines aktivitätsbasierten Anorexia nervosa (ABA) Tiermodells, das eine Intervention mit PUFA oder Probiotika erhält, durch Analyse der Wirkung der Interventionen auf das Darmmikrobiom;

WP 2.2: Vertiefung des Verständnisses der zugrunde liegenden Pathophysiologie der Darm-Gehirn-Interaktion mit Hilfe eines ABA-Tiermodells, das eine FMT mit Stuhlproben von Patientinnen und HCs erhält;

WP 2.3: Vertiefung des Verständnisses der zugrunde liegenden Pathophysiologie der Darm-Gehirn-Interaktion mit Hilfe eines ABA-Tiermodells, das mit ClpB-Protein immunisiert wird.

Aktuelle Entwicklungen

Das Interesse an der Mikrobiota-Darm-Gehirn-Achse wächst weiterhin, auch nachdem die praktische Umsetzung des Projekts abgeschlossen ist. Dies unterstreicht die anhaltend hohe Relevanz und Bedeutung unseres Forschungsprojekts. Weltweit sind zahlreiche neue Studien zum Thema Darmmikrobiom bei AN während des Projektzeitraums durch verschiedene Forschungsgruppen entstanden. Interessanterweise wenden nur wenige davon die Shotgun-Metagenom-Sequenzierung an, um mikrobielle Signaturen im Darmmikrobiom von Patientinnen im Vergleich zu HCs zu identifizieren (Fan et al. 2023; Fouladi et al. 2022) und nur wenige analysieren die Proben longitudinal (Mack et al. 2016; Fouladi et al. 2022; Prochazkova et al. 2021), und keine davon umfasst einen einjährigen Nachverfolgungszeitraum. Bezüglich der Tiermodelle sind drei Studien, die über Stuhltransplantationen in Tiermodellen berichten (Fan et al. 2023; Glenny et al. 2021; Hata et al. 2019) besonders relevant und bahnbrechend und helfen, unsere eigenen Ergebnisse im Kontext des aktuellen Forschungsstandes zu interpretieren.

Projektumsetzung

Der vorliegende Bericht konzentriert sich auf die Arbeitspakete, die am Standort Kiel durchgeführt wurden. Ein separater Bericht an das BMBF für den Standort Aachen wurde bereits eingereicht, und ein Abschlussbericht für das gesamte Konsortium wird zu einem späteren Zeitpunkt bereitgestellt.

Verzögerungen und Herausforderungen

Der ursprüngliche Zeitplan konnte aus verschiedenen Gründen nicht eingehalten werden, wie schon in den Zwischenberichten ausführlich erläutert. Zu Beginn erwies sich die detaillierte Planung und Umsetzung des Forschungsprojekts innerhalb des internationalen Konsortiums als unerwartet zeitaufwendig. Die praktische Umsetzung der Studien oder Arbeitspakete war aufgrund unterschiedlicher nationaler regulatorischer Richtlinien und Gesetze, wie z. B. zu Ethik und Datenschutz, sehr langwierig. Es dauerte einige Zeit, bis alle klinischen Studien ein positives Ethikvotum erhielten und alle Datenschutzfragen geklärt waren und eine Kooperationsvereinbarung zwischen allen Partnern getroffen wurde. Auch die Genehmigungen für die Tierversuche nahmen erheblich Zeit in Anspruch. Sowohl die humanen als auch die Tier-Studien wurden zudem durch COVID-bedingte Einschränkungen an allen Konsortialstandorten erheblich verzögert.

Verzögerungen bei der digitalen Datenbankimplementierung

Aufgrund von Schwierigkeiten bei der Rekrutierung eines Datenmanagers und anschließenden Verzögerungen während der COVID-Pandemie mussten Planungen für das Datenmanagement angepasst und geändert werden. Für jeden Standort wurde schließlich eine Datenbank (mit der Open-

Source-Software „open clinica“) entsprechend den an den verschiedenen Standorten verwendeten Erhebungsbögen entworfen und zur Dateneingabe an jeden Standort verteilt.

Finanzplan

Der Finanzplan wurde weitgehend eingehalten (detaillierte Darstellung im Finanzbericht). Wir erhielten eine kostenneutrale COVID-bedingte Verlängerung des Projekts um 21 zusätzliche Monate, da die statistischen Analysen notwendigerweise erst abgeschlossen werden konnten, als alle Daten vollständig vorlagen, also nach Abschluss der Arbeitspakete der anderen Projektpartner.

Wesentliche Ergebnisse und Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen

Der folgende Abschnitt berichtet über veröffentlichte und bisher unveröffentlichte Ergebnisse, die in Zusammenarbeit mit Mitgliedern des Konsortiums erzielt wurden.

WP 1.1 - Vorläufige Ergebnisse

Die Mikrobiomanalysen und Datenauswertungen der Beobachtungsstudie des Pilotprojekts (MaAN-Studie) erfolgte parallel zur Rekrutierung von Patientinnen des MiGBAN-Projekts und hat bereits zu bedeutenden Erkenntnissen im Bereich der Mikrobiota-Darm-Gehirn-Achse bei AN beigetragen. Bisher resultierten drei Publikationen aus dieser Pilot-Studie (Andreani et al. 2024; Schulz et al. 2021; Specht et al. 2022). Die Arbeit von Andreani und Kollegen (2024, Gut Microbes) umfasst Daten von 57 akut erkrankten jugendlichen Patientinnen mit AN, die größte Stichprobe der drei Publikationen, und enthält Daten zum zeitlichen Verlauf mit bis zu 9 Messzeitpunkten einschließlich einer einjährigen Nachuntersuchung. Im Rahmen der statistischen Auswertungen wurden zum Nachuntersuchungszeitpunkt zwei Gruppen betrachtet: eine Gruppe mit gewichtsrehabilitierten Patientinnen, die ihr Gewicht nach der Entlassung im gesunden Bereich halten konnten (definiert als BMI \geq 15. Perzentile gemäß KiGGS-Referenzstichprobe), und eine Gruppe, die nach der Entlassung erneut Gewicht verlor (definiert als BMI $<$ 15. Perzentile gemäß KiGGS-Referenzstichprobe). Die Mikrobiomuntersuchung wurde mittels 16S-rRNA-Gen-Sequenzierung durchgeführt. Die wichtigsten Ergebnisse sind nachfolgend kurz dargestellt.

Die Mikrobiom-Zusammensetzung von Patientinnen mit AN zeigte die größten Unterschiede im Vergleich zu HCs im akuten Stadium der Krankheit und bei Patientinnen mit dem niedrigsten Gewicht. Auch ein Jahr nach Krankheitsbeginn blieben Restveränderungen bestehen, auch bei den gewichtsrehabilitierten Patientinnen. Die Mikrobiom-Zusammensetzung und Alpha-Diversitätsindizes in den beiden Gruppen über alle Messzeitpunkte hinweg sind in den Abbildungen 1-2 (Andreani et al. 2024) dargestellt.

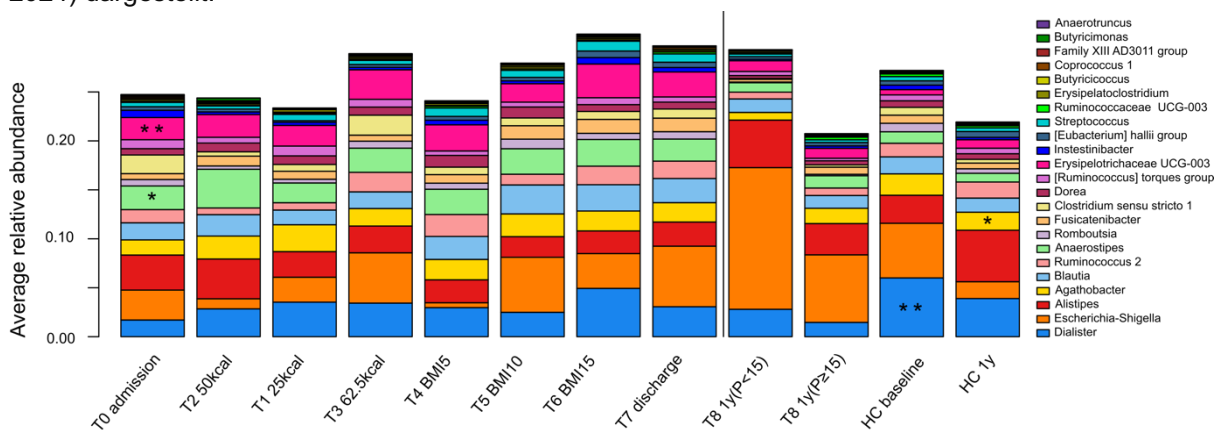


Abbildung 1: Taxa, die eine signifikant unterschiedliche Abundanz zwischen AN-Patientinnen zu verschiedenen Zeitpunkten oder zwischen AN-Patientinnen und HCs aufweisen.

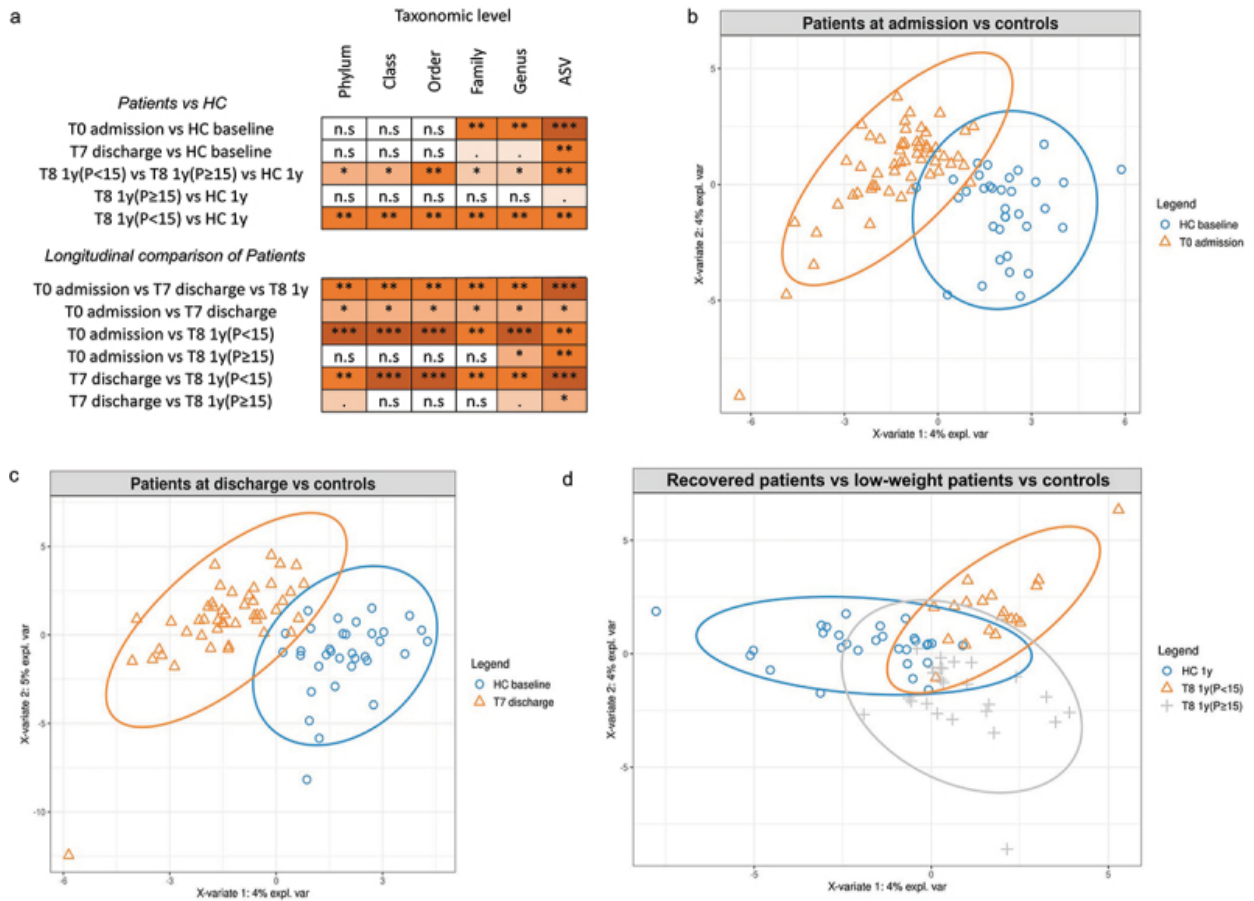


Abbildung 2 a) paarweise Vergleiche des fäkalen Mikrobioms auf verschiedenen taxonomischen Ebenen, zwischen Patientinnen mit AN zu verschiedenen Zeitpunkten und HCs sowie longitudinalen Vergleichen von Patientinnen; b) c) d) PLS-DA basierend auf Bray-Curtis-Dissimilarität von fäkalen Proben von Patientinnen bei Aufnahme, Entlassung und einem Jahr (unterteilt in niedriges Gewicht und gewichtserholt) mit Kontrollen zu den entsprechenden Zeitpunkten.

Unsere Daten konnten auch mikrobielle Taxa bei Aufnahme identifizieren, die eine Korrelation zum BMI-SDS nach einem Jahr aufweisen.

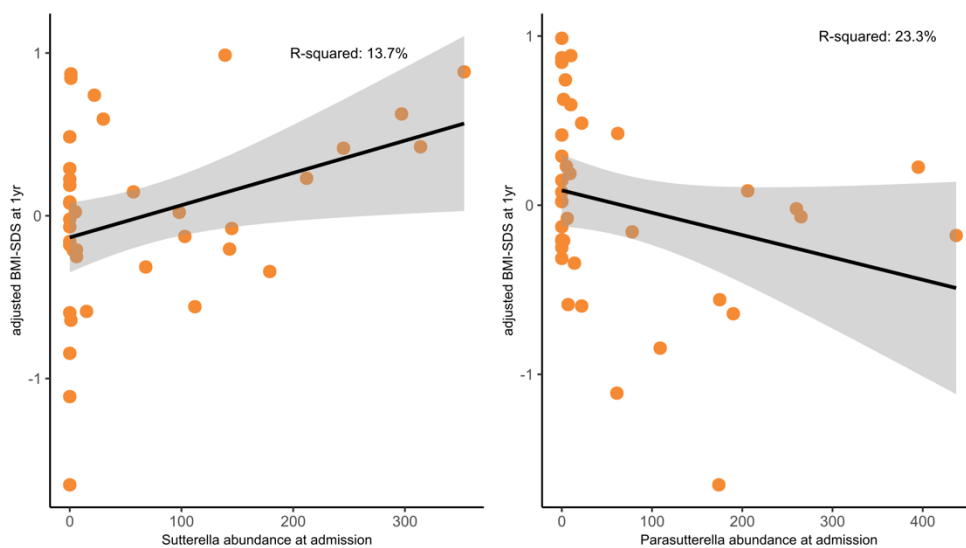


Abbildung 3: Taxa, die zum Zeitpunkt der stationären Aufnahme eine Korrelation mit dem BMI-SDS nach einem Jahr aufweisen.

WP 1.1 - Weitere Analysen der MaAN Pilot-Studie

Mit dem Ziel, eine bessere Auflösung bei Taxa zu erzielen, die mit dem Krankheitsverlauf in Zusammenhang stehen könnten, analysierten wir einen Teil der Proben (Patientinnenproben bei Aufnahme, Entlassung, Nachuntersuchung nach einem Jahr sowie zwei Zeitpunkte für Kontrollen) mittels Shotgun-Metagenom-Sequenzierung. Die Analyse der Daten ist noch im Gange, aber erste Untersuchungen ergaben vergleichbare Ergebnisse zu unserer vorherigen Studie basierend auf 16S Sequenzierung (Daten nicht gezeigt). Prädiktionsanalysen ergaben 15 Bakterienarten bei Aufnahme, die einen Zusammenhang mit der Behandlungsdauer zeigen und 22 Taxa bei Aufnahme, die mit dem BMI-SDS nach einem Jahr im Zusammenhang stehen (p -Wert $< 0,05$).

WP 1.1 - Mikrobiom von Patientinnen und Kontrollen bei Aufnahme von drei unterschiedlichen Standorten

Durch die Projektpartner in Aachen, Wien und Utrecht wurden insgesamt 241 jugendliche Patientinnen mit AN sowie gesunde Kontrollen neu rekrutiert. Wir analysierten das fäkale Mikrobiom zum Zeitpunkt der stationären Aufnahme (in Aachen und Wien) bzw. zum baseline Zeitpunkt (in Utrecht, wo Patientinnen ambulant behandelt wurden) mittels Shotgun-Metagenom-Sequenzierung, um ein tieferes Verständnis der mit AN assoziierten Taxa zu gewinnen, eine bessere Identifizierung der Taxa sowie Einblicke in das funktionelle Repertoire der mikrobiellen Gemeinschaften zu erhalten. Die vollständige statistische Analyse der Daten ist noch nicht abgeschlossen, aber erste Auswertungen zeigen signifikante Unterschiede im Darmmikrobiom von Patientinnen und Kontrollen sowie Unterschiede im Mikrobiom zwischen Standorten (Abbildung 4a). Interessanterweise beobachteten wir bei der Analyse der Funktionen der Gemeinschaften (d. h. der Stoffwechselwege) einen Effekt des Gesundheitszustands (AN vs. HC), jedoch keinen Einfluss des Standorts (Abbildung 4b).

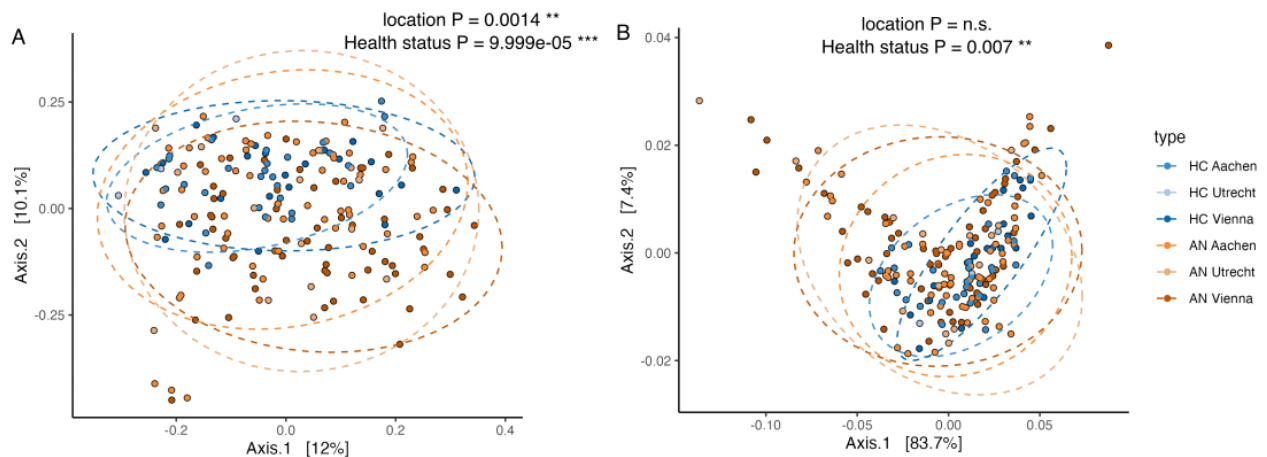


Abbildung 4: PCA-Plot der Bray-Curtis-Distanzen a) der bakteriellen Gemeinschaft auf Art-Ebene der fäkalen Proben von Patientinnen und Kontrollen aus den drei Standorten; b) der Stoffwechselwege der mikrobiellen Gemeinschaften.

WP 1.2 - Bewertung der Wirksamkeit der Behandlung mit PUFA in einem RCT

Der Standort Kiel war intensiv an der Planung des RCT beteiligt, einschließlich der Fallzahlplanung, der Entwicklung des detaillierten Studienprotokolls (veröffentlicht durch (Keller et al. 2022)), der Entwicklung von Erhebungsbögen und der stratifizierten Blockrandomisierung mit einem 1:1-Zuteilungsverhältnis. Die Studie ist eine longitudinale, doppelblinde, randomisierte, placebo-kontrollierte Überlegenheitsstudie mit einer zusätzlichen Beobachtungsstudie mit gesunden Kontrollen.

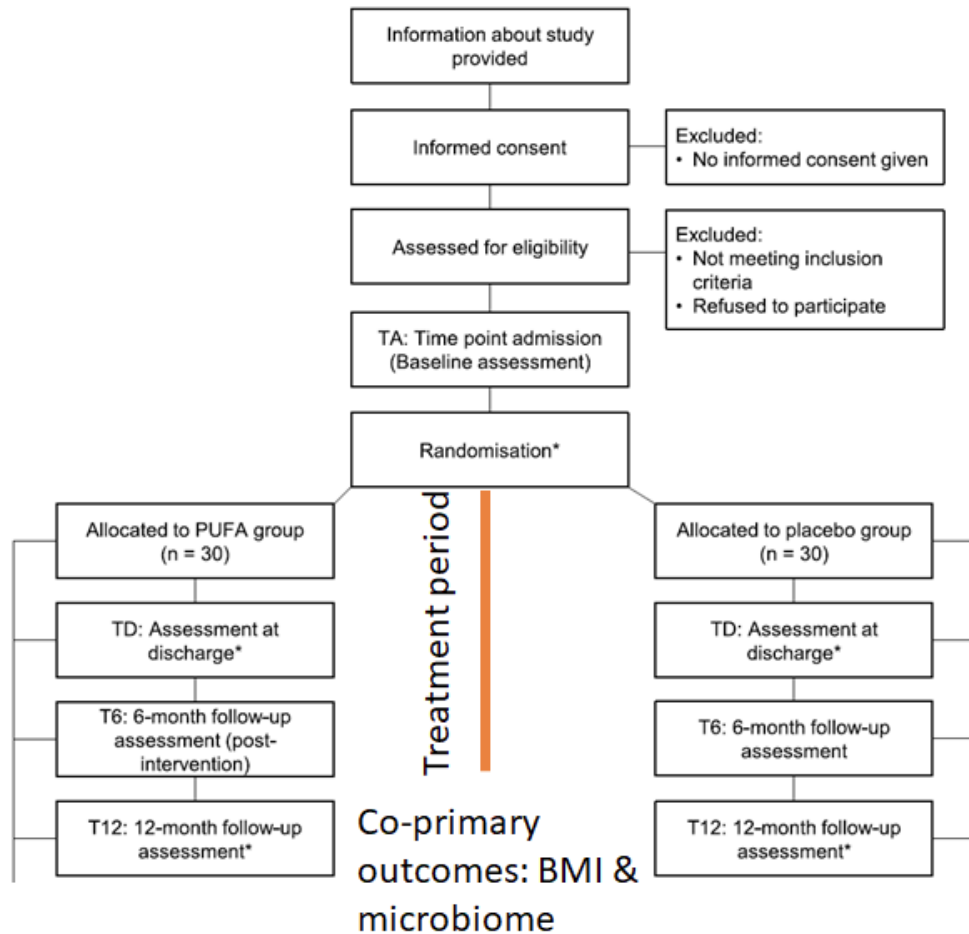


Abbildung 5: Studiendesign des RCT (geplante Rekrutierungszahlen, für tatsächliche Zahlen siehe Text)

Die Rekrutierung der geplanten Anzahl an Patientinnen (N=61) an der RWTH Aachen wurde im Juni 2022 mit der Aufnahme der letzten Patientin mit AN abgeschlossen. Alle Patientinnen wurden zur Behandlung ihrer AN stationär aufgenommen und erhielten eine intensive multimodale Behandlung wie üblich (treatment as usual, TAU), einschließlich Ernährungs-, psychiatrischer und psychotherapeutischer Therapien. Die Gewichtsrehabilitation erfolgte im Rahmen von zunächst stationärer, anschließend ggf. tagesklinischer und/oder häuslicher Behandlung in der Aachener Essstörungenstation. Zusätzlich zu dieser TAU, die in beiden Studienarmen gleich war, wurden 32 Patientinnen in den PUFA-Interventionsarm randomisiert, während 29 Patientinnen in den Placeboarm randomisiert wurden. Die Patientinnen erhielten für die Dauer von 6 Monaten eine tägliche Dosis von 1500 mg DHA, 900 mg EPA und 15 µg Vitamin D. Eine Nachuntersuchung fand 12 Monate nach der stationären Aufnahme statt. Die longitudinale Analyse des Mikrobioms bei Aufnahme, Entlassung, sechs Monate und zwölf Monate nach der Aufnahme wurde mittels 16S-rRNA-Gen-Sequenzierung durchgeführt.

Als co-primäre Endpunkte wurden BMI (kg/m²) und die Mikrobiota-Zusammensetzung nach 12 Monaten gewählt. Für die Mikrobiota-Zusammensetzung basierte die primäre Analyse auf Beta-Diversität innerhalb und zwischen PUFA- und Placebo-Gruppen. Sekundär wurden auch einzelne Taxa-Abundanzen sowie Alpha-Diversität betrachtet. Während Mikrobiota-Eigenschaften keine direkte klinische Relevanz haben, ist die Gewichtsrehabilitation eines der wichtigsten Ziele bei der Behandlung von AN, was den BMI als co-primären Endpunkt begründet. Sekundäre Endpunkte umfassen gastrointestinale Symptome, Essstörungspsychopathologie und komorbide Störungen (mittels Fragebögen quantifiziert) sowie Serum-, Darm-Permeabilitäts- und Entzündungsmarker. Schließlich

wurden longitudinale Veränderungen der oben genannten Endpunkte zwischen AN-Patientinnen und HCs unter Verwendung von Daten aller vier (zwei für HCs) Mess-Zeitpunkte verglichen.

Vor der eigentlichen statistischen Analyse wurden umfangreiche Überprüfungen der Daten auf Vollständigkeit und Plausibilität durchgeführt. Datenkorrekturen wurden in Zusammenarbeit mit den Projektpartnern an der RWTH Aachen eingearbeitet. Formale statistische Analysen wurden an dem endgültigen Datensatz nach dem Intention-to-Treat-Prinzip durchgeführt. Für den co-primären Endpunkt Mikrobiom wurde die Zusammensetzung zwischen PUFA- und Placebo-Gruppen unter Verwendung einer nicht-parametrischen Analyse basierend auf Beta-Diversität (Permutational Multivariate Analysis of Variance Using Distance Matrices) einschließlich relevanter baseline Kovariablen (Alter, BMI bei Krankheitsbeginn, BMI bei Aufnahme und Krankheitsdauer) verglichen. Für den anderen co-primären Endpunkt BMI (12 Monate nach Aufnahme) wurde ein gemischtes lineares Modell mit Messwiederholungen verwendet, um die Überlegenheit der PUFA-Behandlung gegenüber Placebo zu testen. Dieses Modell umfasste ebenfalls die Kovariablen Alter, BMI bei Krankheitsbeginn, BMI bei Aufnahme und Krankheitsdauer. Alle verfügbaren weiteren BMI-Messungen (insbesondere bei Entlassung und nach 6 Monaten) wurden als abhängige Variable im gemischten Modell verwendet, indem sowohl ein zufälliger Patientinnen-ID-Term als auch ein Interaktionsterm zwischen Behandlungsarm und Zeitpunkten eingeschlossen wurden. Da die Studie einer Phase-II-Studie entspricht, lag der Fokus auf den 95% Konfidenzintervallen der Effektgrößenschätzungen, die als geschätzte marginale Mittelwerte (estimated marginal means) pro Behandlungsarm berechnet wurden. Zudem wurden p-Werte berechnet. Weitere explorative Analysen der Mikrobiom-Daten zu allen Zeitpunkten und im Vergleich zu gesunden Kontrollen wurden ebenfalls durchgeführt. Sekundäre Endpunkte wie Essstörungspsychopathologie wurden analog zur primären BMI-Analyse analysiert, zusätzlich unter Berücksichtigung der Ausgangswerte des Endpunkts (bei Aufnahme). Darüber hinaus wurden Alpha-Diversitätsmaße zwischen PUFA- und Placebo-Gruppen unter Verwendung von gemischten linearen Modellen verglichen, die z. B. Alter, Medikation und klinische Kovariablen wie BMI und Psychopathologie berücksichtigen. Analysen unter Verwendung ähnlicher Modelle für individuelle Taxa-Häufigkeiten sind aktuell noch im Gange. Korrelationen zwischen Taxa-Häufigkeiten oder Alpha-Diversitätsmaßen und Patientinnendaten innerhalb der Zeitpunkte werden mittels generalisierter linearer Modelle ausgewertet, während gemischte lineare Modelle verwendet werden, um Zusammenhänge über die Zeitpunkte hinweg zu analysieren. Laufende explorative Analysen werden die Mikrobiota-Zusammensetzung bei Aufnahme mit klinischen Endpunkten assoziieren und Eigenschaften von Therapie-Respondern gegenüber Non-Respondern mithilfe von „Indicator-Species“-Analysen und prädiktiven maschinellen Lernalgorithmen (z. B. Random-Forest-Modelle) identifizieren. Schließlich wurde neben dem randomisierten Vergleich zwischen PUFA- und Placebo-Gruppen auch ein Vergleich zwischen HCs und Patientinnen (in beiden Armen) durchgeführt, um Unterschiede in der Darmmikrobiom-Zusammensetzung und -Diversität zwischen Patientinnen mit AN und HCs in der akuten Krankheitsphase (bei Aufnahme zur stationären Behandlung) wie auch im Verlauf zu analysieren.

Alle Ergebnisse werden derzeit in Zusammenarbeit mit allen Projektpartnern zur Veröffentlichung vorbereitet.

WP 1.3 - Bewertung der Wirksamkeit der Behandlung mit Probiotika in einem RCT

Auch für dieses RCT war der Standort Kiel intensiv an der Planung beteiligt, einschließlich der Fallzahlplanung, der Entwicklung des detaillierten Studienprotokolls (veröffentlicht in (Gröbner et al. 2022)), der Entwicklung von Erhebungsbögen und der stratifizierten Blockrandomisierung mit einem 1:1-Zuteilungsverhältnis. Die Studie ist ebenfalls eine longitudinale, doppelblinde, randomisierte, Placebo-kontrollierte Überlegenheitsstudie mit einer Beobachtungsstudie mit gesunden Kontrollen.

An den Abteilungen für Kinder- und Jugendpsychiatrie der Medizinischen Universität Wien und der Medizinischen Universität Innsbruck begann die Rekrutierung der geplanten Anzahl von Patientinnen (N=72) im November 2019 und wurde im August 2022 abgeschlossen. Alle Patientinnen wurden zur stationären Behandlung von AN aufgenommen und erhielten eine intensive multimodale Behandlung

wie üblich (TAU), einschließlich Ernährungs-, psychiatrischer und psychotherapeutischer Therapie. Diese wurde stationär in der Wiener oder Innsbrucker Essstörungsabteilung durchgeführt. Zusätzlich zu dieser TAU, die in beiden Studienarmen gleich war, erhielt die Hälfte der Patientinnen eine Probiotika-Intervention und die andere Hälfte ein Placebo. Die longitudinale Analyse des Mikrobioms bei Aufnahme, Entlassung, sechs Monaten und zwölf Monaten nach der Aufnahme wurde mittels 16S-rRNA-Gen-Sequenzierung durchgeführt. Datenüberprüfungen und formale statistische Analysen wurden in Kiel auf die gleiche Weise wie für das Aachener RCT durchgeführt. Alle Ergebnisse werden derzeit in Zusammenarbeit mit allen Projektpartnern zur Veröffentlichung vorbereitet.

WP 2.1 - Bewertung der Wirksamkeit der Behandlung mit Probiotika und PUFA in einem Tiermodell von AN

Interventionsstudien an der RWTH Aachen (PI Seitz) wurden unter Verwendung eines gut etablierten Tiermodells für AN (aktivitätsbasierte Anorexia nervosa, ABA) durchgeführt, bei dem Ratten eine Intervention mit PUFA oder Probiotika erhielten. Insgesamt analysierten wir die mikrobielle Zusammensetzung von 366 Proben, die von 60 Ratten (aufgeteilt in 4 Gruppen: Kontrollgruppe [K-Gruppe; d. h. Ratten, die keine Intervention erhielten und kein ABA durchliefen], Ratten, die ABA durchliefen und keine Intervention erhielten [Gruppe V]; Ratten, die ABA durchliefen und PUFA erhielten [Gruppe O]; Ratten, die ABA durchliefen und Probiotika erhielten [Gruppe P]) zu sechs Zeitpunkten und technischen Kontrollen gesammelt wurden. Die relevanten Zeitpunkte waren T1 (Ankunft in der Einrichtung), T2 (Ende der Gewöhnungsphase), T3 (Erreichen des Zielgewichts), T4 und T5 (chronischer Hunger) und T6 (Ende des Experiments).

Insgesamt stellten wir fest, dass ABA mit einer Verringerung der sogenannten „evenness“ (Gleichmäßigkeit) des Mikrobioms einherging, die bei Ratten, die die Probiotika erhielten, nicht beobachtet wurde. Weiterhin wurde die mikrobielle Zusammensetzung hauptsächlich durch ABA und nicht durch die Intervention beeinflusst, wie bei der Analyse der Beta-Diversität der Gemeinschaft der vier Gruppen bei T3 beobachtet wurde.

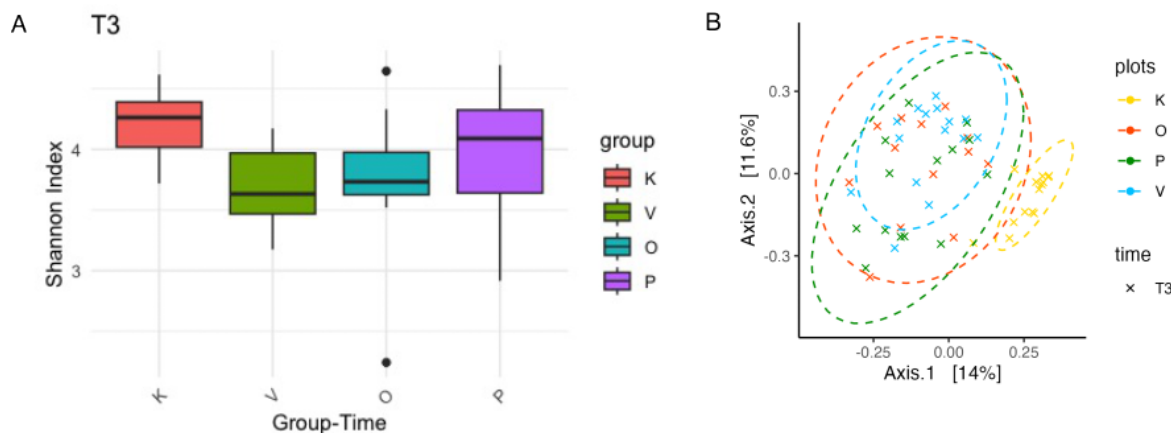


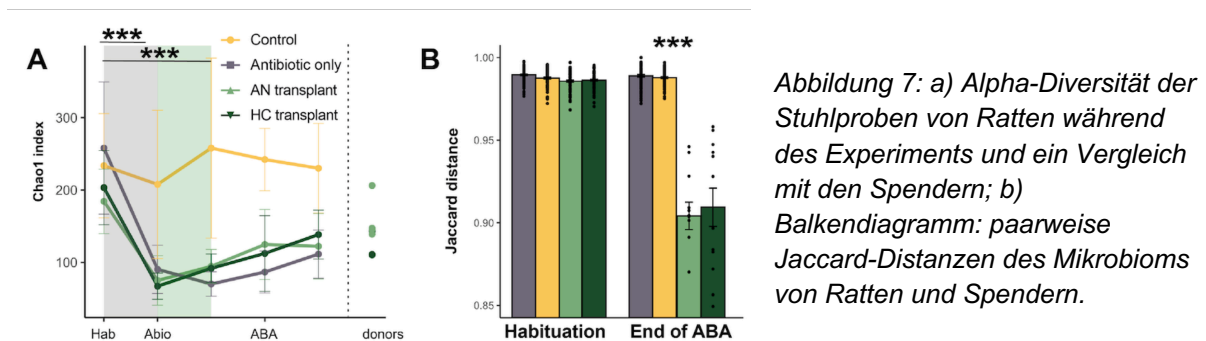
Abbildung 6: a) Alpha-Diversität der mikrobiellen Gemeinschaften von Tieren bei T3 (Verlust von 20 % des Körpergewichts und nach Beginn der Intervention). b) PCA der Bray-Curtis-Dissimilaritätsmatrix von Stuhlproben bei T3.

Insgesamt stellten wir keine Wirkung der beiden Interventionen auf das Darmmikrobiom fest, wie in paarweisen Vergleichen beobachtet wurde (PERMANOVA P-Wert = 1).

WP 2.2 - Anwendung eines Tiermodells basierend auf ABA und FMT mit Stuhlproben von AN-Patientinnen und HCs

In Zusammenarbeit mit PI Adan (Utrecht) analysierten wir die Wirksamkeit der fäkalen Mikrobiota-Transplantation (FMT) bei antibiotisch behandelten Ratten in zwei unabhängigen Experimenten. Das erste zielte darauf ab, die Wirkung von FMT im ABA-Modell zu untersuchen, während die zweite

Studie die Wirkung von FMT auf flexibles Verhalten untersuchte. Die Ergebnisse der ersten Studie sind zur Veröffentlichung eingereicht und derzeit unter Begutachtung bei der Zeitschrift *Biological Psychiatry*. Unsere Studie zeigte, dass die antibiotische Behandlung wirksam war, um das Darmmikrobiom der Wistar-Ratten deutlich zu reduzieren und dass das Mikrobiom der Ratten nach dem Ende der antibiotischen Behandlung schnell zu einer normalen bakteriellen Besiedelung zurückkehrte. FMT erhöhte die Alpha-Diversität der Proben und erreichte vergleichbare Niveaus zu den Stuhlproben der Spender. Die Beta-Diversitätsanalyse basierend auf Jaccard-Distanzen (und damit unter Berücksichtigung des Vorhandenseins/Fehlens von Bakterienarten) zeigte einen signifikant höheren Grad an Ähnlichkeit der Ratten, die das FMT erhielten, mit dem jeweiligen Spender als unbehandelte Ratten oder Ratten, die nur die antibiotische Behandlung erhielten.



Insgesamt legen unsere Analysen nur eine begrenzte Wirksamkeit der FMT im antibiotisch behandelten Rattenmodell nahe. Insbesondere am Ende von ABA teilten 22,4 % der AN- und 13,7 % der HC-Empfänger-Ratten die amplicon-Sequenzvarianten (ASVs) mit ihrem jeweiligen Spender. Pro Spender variierte die Überlappung zwischen 11,8 % bis 31,5 % für AN und zwischen 10,0 % bis 12,3 % für die HC-Gruppe.

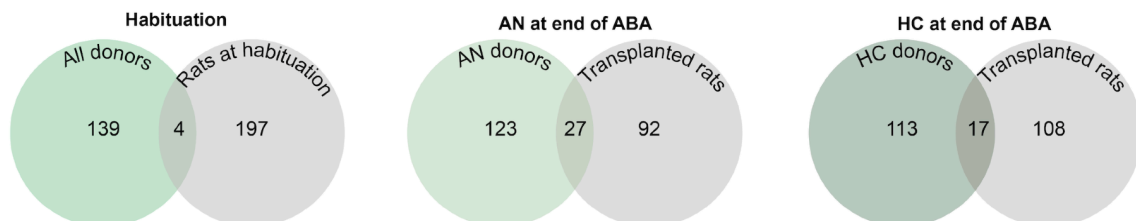


Abbildung 8: Anzahl der übereinstimmenden ASVs zwischen Spendern und Ratten bei der Gewöhnung (links) und am Ende von ABA bei Ratten, die mit Stuhlproben von AN-Patientinnen (Mitte) und HCs (rechts) transplantiert wurden.

Die eingeschränkte Ähnlichkeit zwischen den Ratten und den jeweiligen Spendern könnte der Grund sein, warum die FMT das Ergebnis des ABA-Modells nicht beeinflusste. Interessanterweise zeigte die nur antibiotisch behandelte Gruppe jedoch eine reduzierte Überlebensrate sowie geringeres Körpergewicht und Temperatur während ABA.

In der zweiten Studie, die im *International Journal of Eating Disorders* veröffentlicht wurde, untersuchten wir, ob das AN-abgeleitete Mikrobiom die kognitive Flexibilität, Angst und Dopamin-Signalisierung beeinflusst, indem wir FMT in Tyrosinhydroxylase-cre-Ratten verwendeten. Auch in dieser Studie konnten wir die Wirksamkeit der antibiotischen Behandlung bei der teilweisen Reduzierung des Mikrobioms der Ratten nachweisen. FMT erhöhte erfolgreich die beobachtete Anzahl an ASVs der Proben und brachte sie auf vergleichbare Niveaus zu den Stuhlproben der Spender. Die Beta-Diversitätsanalyse basierend auf Bray-Curtis-Distanzen (und damit unter Berücksichtigung auch der relativen Häufigkeit von Bakterienarten) zeigte einen signifikant höheren

Grad an Ähnlichkeit der Ratten, die das FMT erhielten, mit dem jeweiligen Spender als unbehandelte Ratten oder Ratten, die nur die antibiotische Behandlung erhielten.

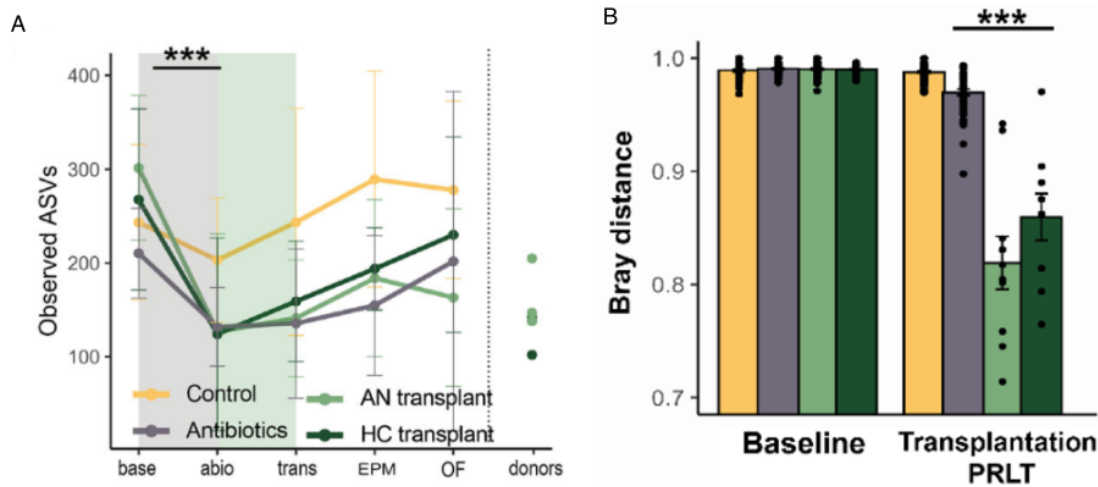


Abbildung 9: A) Alpha-Diversität der Stuhlproben von Ratten während des Experiments und im Vergleich mit den Spendern; B) Balkendiagramm: paarweise Distanzen des Mikrobioms von Ratten und Spendern.

Auch in diesem Fall legen unsere Analysen nur eine begrenzte Wirksamkeit der FMT nahe. Das Rattenmikrobiom bei Baseline teilte einen relativ niedrigen Prozentsatz an ASVs (0,84 % der ASVs) im Vergleich nach der Transplantation. Die AN- und HC-transplantierte Gruppe teilte teilweise ASVs mit ihren Spendern (AN 22,0 %, HC 9,7 %). Beim Betrachten des Prozentsatzes der geteilten ASVs pro Spender beobachteten wir eine große Variabilität in der Anzahl der geteilten ASVs, die von 23,0 % (Gruppe transplantiert mit AN#2) bis 5,2 % (Gruppe transplantiert mit HC#2) reichte.

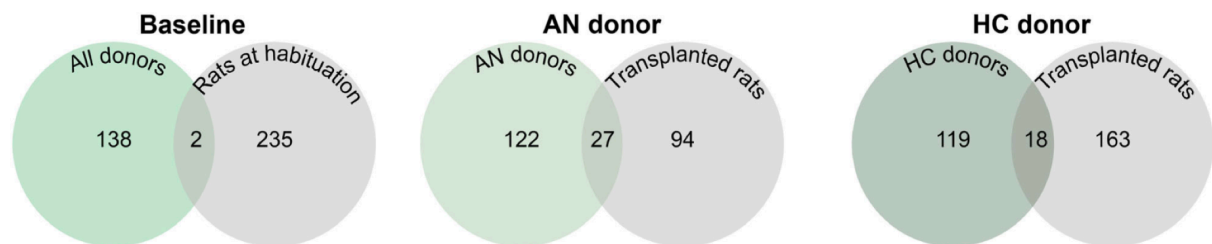


Abbildung 10: Anzahl der übereinstimmenden ASVs zwischen Spendern und Ratten bei der Gewöhnung (links) und am Ende von ABA bei Ratten, die mit Stuhlproben von AN-Patientinnen (Mitte) und HCs (rechts) transplantiert wurden.

Unsere Studie zeigte keine direkte Auswirkung des AN-assoziierten Darmmikrobioms auf die kognitive Flexibilität oder Angstverhalten unter Verwendung eines präklinischen Modells; wir beobachteten eher eine Abnahme des Aufgabenengagements nach antibiotisch-induzierter Dysbiose, was dennoch unterstreicht, dass die Anwesenheit eines Darmmikrobioms für diese Verhaltensweisen wichtig ist.

WP 2.3 - Anwendung eines Tiermodells basierend auf ABA und Immunisierung mit ClpB

In Zusammenarbeit mit PI Fetissov (Rouen) analysierten wir die Wirkung der Immunisierung mit dem bakteriell-abgeleiteten ClpB-Protein auf das Ergebnis des ABA-Modells und auf die Zusammensetzung

des Darmmikrobioms. Zwei unabhängige Experimente wurden an SPF C57BL/6-Mäusen unter Verwendung verschiedener Mengen von ClpB durchgeführt. Jedes Experiment umfasste die Verwendung von 30 Mäusen und Stuhlproben wurden zu Beginn und am Ende des Experiments gesammelt. Eine vorläufige Untersuchung der Daten zeigt keine signifikante Wirkung der ABA-Aktivität oder Immunisierung auf die Mikrobiom-Artvielfalt (gemessen durch den Chao1-Index, Abbildung 1A, lineares Modell $p > 0,05$ für alle Vergleiche). Andererseits beeinflusste ABA die Gleichmäßigkeit (evenness) der Gemeinschaft mit signifikant niedrigeren Shannon-Index-Werten in der Kontrollgruppe und der immunisierten Gruppe, die ABA durchlief (lineares Modell $p(\text{Kontrolle vs clpB}) > 0,05$; $p(\text{Kontrolle vs ABA}) = 0,009$; $p(\text{clpB vs ABA}) = 0,0005$).

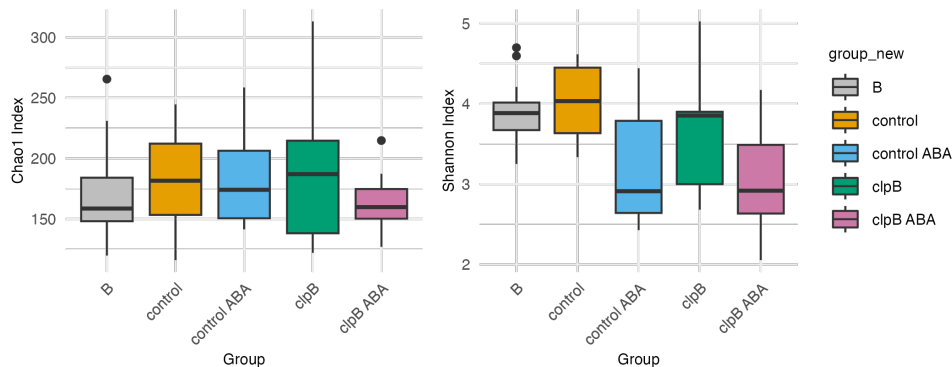


Abbildung 11: Alpha-Diversitätsmaße von Stuhlproben von Mäusen bei Baseline (Gruppe B) und am Ende des Experiments bei Mäusen, die keine Behandlung erhielten (Kontrolle), keine Immunisierung erhielten und ABA durchliefen (Kontrolle ABA), nur Immunisierung erhielten (clpB) und ABA nach der Immunisierung durchliefen (clpB ABA). Zwei Alpha-Diversitätsmaße wurden gewählt: Chao1 (links) und Shannon-Index (rechts).

Die Analyse der Beta-Diversität der Gemeinschaft basierend auf Bray-Curtis-Distanzen zeigte einen größeren Einfluss der Zeit als der Immunisierung oder ABA auf das Darmmikrobiom (P-Wert (Zeit) = $1.00E-04$, P-Wert (Gruppen) = $0,0006$).

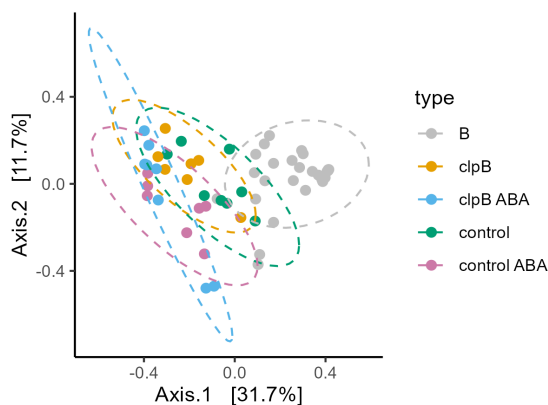


Abbildung 12: PCA-Plot der Bray-Curtis-Distanzen von Proben bei Baseline und am Ende des Experiments bei Mäusen, die keine Behandlung erhielten (Kontrolle), keine Immunisierung erhielten und ABA durchliefen (Kontrolle ABA), nur Immunisierung erhielten (clpB) und ABA nach der Immunisierung durchliefen (clpB ABA).

Proben aus dem zweiten Experiment werden derzeit sequenziert und zusammen mit den Ergebnissen des ersten Experiments sowie den Ergebnissen des Körpergewichts, der körperlichen Aktivität, der Serumkonzentration von ClpB und anti- α -MSH-IgG (Analysen stehen noch aus bei unserem Kooperationspartner PI Fetissov) analysiert.

Publikationsplan

Während des letzten mehrtägigen persönlichen Projekttreffens mit Vertretern des gesamten Konsortiums Anfang Juli 2024 in Rouen entwickelten wir einen detaillierten Publikationsplan, der eine Aufteilung der Ergebnisse aller Arbeitspakete in mehrere Artikel mit einem spezifischen Zeitplan umfasst. Die Diskussion führte zu festgelegten Zeitplänen, zugewiesenen Aufgaben und geplanten Meilensteinen im Auswertungs- und Veröffentlichungsprozess. Der Publikationsplan, der im Konsens mit dem gesamten Konsortium erstellt wurde und eine Aufschlüsselung der verschiedenen Forschungsfragen und Arbeitspakete enthält, ist am Ende des Berichts angehängt (unter „2. Überblick über weitere geplante Arbeiten“).

Übersicht über weitere geplante Arbeiten

Obwohl das MiGBAN-Projekt an den meisten Standorten formal beendet ist, finden weiterhin regelmäßige Projekttreffen statt, um die Auswertung der Daten und die Veröffentlichung der Ergebnisse voranzutreiben.

Kommunikation der Ergebnisse

Hinsichtlich der Kommunikation unserer Ergebnisse planen wir, diese so bald wie möglich durch Artikel in wissenschaftlichen Zeitschriften zu veröffentlichen und auf Konferenzen zu präsentieren, um sie der wissenschaftlichen Gemeinschaft zu vermitteln. Während des Projektzeitraums wurden bereits mehrere Publikationen erstellt, die im nächsten Abschnitt aufgeführt sind.

1. Vorhabensspezifische Publikationen (ausschließlich Publikationen mit Angabe des Förderkennzeichens)

- Kooij KL, Andreani NA, Keller L, Trinh S, van der Gun LL, Hak J, Garner K, Luijendijk M, Drost L, Danner UN, van Elburg A, **Dempfle A**, Seitz J, Herpertz-Dahlmann B, **Baines J**, Adan RAH. Antibiotic-induced microbial dysbiosis worsened outcomes in the activity-based anorexia model. Submitted to Biological Psychiatry.
- Kooij KL, Andreani NA, van der Gun LL, Keller L, Trinh S, van der Vijgh B, Luijendijk M, **Dempfle A**, Herpertz-Dahlmann B, Seitz J, van Elburg A, Danner UN, **Baines J**, Adan RAH. Fecal microbiota transplantation of patients with anorexia nervosa did not alter flexible behavior in rats. *Int J Eat Disord.* 2024 Jun 27. doi: 10.1002/eat.24231. Epub ahead of print. PMID: 38934721.
- Seitz J, Lahaye E, Andreani NA, Thomas B, Takhliđjt S, Chartrel N, Herpertz-Dahlmann B, **Baines JF**, Fetissov SO. Long-Term Dynamics of Serum α -MSH and α -MSH-Binding Immunoglobulins with a Link to Gut Microbiota Composition in Patients with Anorexia Nervosa. *Neuroendocrinology.* 2024 Jun 8:1. doi: 10.1159/000539316. Epub ahead of print. PMID: 38852579.
- Käver L, Voelz C, Specht HE, Thelen AC, Keller L, Dahmen B, Andreani NA, Tenbrock K, Biemann R, Borucki K, **Dempfle A**, **Baines JF**, Beyer C, Herpertz-Dahlmann B, Trinh S, Seitz J. Cytokine and Microbiome Changes in Adolescents with Anorexia Nervosa at Admission, Discharge, and One-Year Follow-Up. *Nutrients.* 2024 May 23;16(11):1596. doi: 10.3390/nu16111596. PMID: 38892530; PMCID: PMC11174589.
- Andreani NA, Sharma A, Dahmen B, Specht HE, Mannig N, Ruan V, Keller L, **Baines JF**, Herpertz-Dahlmann B, **Dempfle A**, Seitz J. Longitudinal analysis of the gut microbiome in adolescent patients with anorexia nervosa: microbiome-related factors associated with clinical outcome. *Gut Microbes.* 2024 Jan-Dec;16(1):2304158. doi: 10.1080/19490976.2024.2304158. Epub 2024 Jan 31. PMID: 38294867; PMCID: PMC10832965.
- Keller L, **Dempfle A**, Dahmen B, Schreiber S, Adan RAH, Andreani NA, Danner UN, Eisert A, Fetissov S, Fischmeister FPS, Karwautz A, Konrad K, Kooij KL, Trinh S, van der Vijgh B, van Elburg AA, Zeiler M, **Baines J**, Seitz J, Herpertz-Dahlmann B. The effects of polyunsaturated fatty acid (PUFA) administration on the microbiome-gut-brain axis in adolescents with anorexia nervosa (the MiGBAN study): study protocol for a longitudinal, double-blind, randomized,

placebo-controlled trial. *Trials*. 2022 Jul 5;23(1):545. doi: 10.1186/s13063-022-06413-7. PMID: 35790976; PMCID: PMC9254435.

2. Überblick über weitere geplante Arbeiten

2.1 Publikationen in Vorbereitung

- Thomas, B, Andreani NA, Lahaye E, Baines J, Herpertz-Dahlmann B, Seitz J, Fetissov SO (2024) Enterobacterial ClpB and ClpB antibodies in adolescents with anorexia nervosa. Einreichung erwartet im August 2024.

2.2 Weitere erwartete Ergebnisse

- Publikation zur mikrobiellen Gemeinschaften von Stuhlproben der MaAN Pilot-Studie unter Verwendung von Shotgun-Metagenom-Sequenzierung (in Zusammenarbeit mit PI Seitz). Einreichung erwartet im Jahr 2025.
- Publikation zu mikrobiellen Gemeinschaften von Stuhlproben bei Aufnahme aus den drei geografischen Standorten unter Verwendung von Shotgun-Metagenom-Sequenzierung und Beschreibung der klinischen Merkmale der Kohorten (in Zusammenarbeit mit allen Mitgliedern von MIGBAN). Einreichung erwartet im Jahr 2025.
- Publikation zu mikrobiellen Gemeinschaften von Ratten, die Probiotika oder PUFA erhalten (in Zusammenarbeit mit PI Seitz). Einreichung erwartet im Jahr 2025.
- Publikation zu mikrobiellen Gemeinschaften von SPF-Mäusen, die mit ClpB-Protein immunisiert und ABA durchlaufen (in Zusammenarbeit mit PI Fetissov). Einreichung erwartet im Jahr 2025.
- Publikation zu den Ergebnisse des RCT mit PUFA-Intervention (in Zusammenarbeit mit PI Seitz). Einreichung erwartet im Jahr 2025.
- Publikation zu den Ergebnisse des RCT mit Probiotika-Intervention (in Zusammenarbeit mit PI Karwautz). Einreichung erwartet im Jahr 2025.

Literaturliste

- Andreani, Nadia Andrea, Arunabh Sharma, Brigitte Dahmen, Hannah E. Specht, Nina Mannig, Vanessa Ruan, Lara Keller, et al. 2024. "Longitudinal Analysis of the Gut Microbiome in Adolescent Patients with Anorexia Nervosa: Microbiome-Related Factors Associated with Clinical Outcome." *Gut Microbes* 16 (1): 2304158. <https://doi.org/10.1080/19490976.2024.2304158>.
- Cryan, John F., Kenneth J. O'Riordan, Caitlin S. M. Cowan, Kiran V. Sandhu, Thomaz F. S. Bastiaanssen, Marcus Boehme, Martin G. Codagnone, et al. 2019. "The Microbiota-Gut-Brain Axis." *Physiological Reviews* 99 (4): 1877–2013. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2018>.
- Dobrescu, Sandra Rydberg, Lisa Dinkler, Carina Gillberg, Maria Råstam, Christopher Gillberg, and Elisabet Wentz. 2020. "Anorexia Nervosa: 30-Year Outcome." *The British Journal of Psychiatry* 216 (2): 97–104. <https://doi.org/10.1192/bjp.2019.113>.
- Fan, Yong, René Klinkby Støving, Samar Berreira Ibraim, Tuulia Hyötyläinen, Florence Thirion, Tulika Arora, Liwei Lyu, et al. 2023. "The Gut Microbiota Contributes to the Pathogenesis of Anorexia Nervosa in Humans and Mice." *Nature Microbiology*, April. <https://doi.org/10.1038/s41564-023-01355-5>.
- Fouladi, Farnaz, Emily C. Bulik-Sullivan, Elaine M. Glenny, Laura M. Thornton, Kylie K. Reed, Stephanie Thomas, Susan Kleiman, et al. 2022. "Reproducible Changes in the Anorexia Nervosa Gut Microbiota Following Inpatient Therapy Remain Distinct from Non-Eating Disorder Controls." *Gut Microbes* 14 (1): 2143217. <https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2143217>.
- Glenny, Elaine M., Farnaz Fouladi, Stephanie A. Thomas, Emily C. Bulik-Sullivan, Quyen Tang, Zorka Djukic, Yesel S. Trillo-Ordonez, et al. 2021. "Gut Microbial Communities from Patients with Anorexia Nervosa Do Not Influence Body Weight in Recipient Germ-Free Mice." *Gut Microbes* 13 (1): 1897216. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1897216>.
- Gröbner, Eva-Maria, Michael Zeiler, Florian Ph. S. Fischmeister, Kathrin Kollndorfer, Sonja Schmelz, Andrea Schneider, Nina Haid-Stecher, et al. 2022. "The Effects of Probiotics Administration on the Gut Microbiome in Adolescents with Anorexia Nervosa—A Study Protocol for a Longitudinal, Double-blind, Randomized, Placebo-controlled Trial." *European Eating Disorders Review* 30 (1): 61–74. <https://doi.org/10.1002/erv.2876>.
- Hata, Tomokazu, Noriyuki Miyata, Shu Takakura, Kazufumi Yoshihara, Yasunari Asano, Tae Kimura-Todani, Makoto Yamashita, et al. 2019. "The Gut Microbiome Derived From Anorexia Nervosa Patients Impairs Weight Gain and Behavioral Performance in Female Mice." *Endocrinology* 160 (10): 2441–52. <https://doi.org/10.1210/en.2019-00408>.
- Keller, Lara, Astrid Dempfle, Brigitte Dahmen, Samira Schreiber, Roger A. H. Adan, Nadia Andrea Andreani, Unna N. Danner, et al. 2022. "The Effects of Polyunsaturated Fatty Acid (PUFA) Administration on the Microbiome-Gut-Brain Axis in Adolescents with Anorexia Nervosa (the MiGBAN Study): Study Protocol for a Longitudinal, Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial." *Trials* 23 (1): 545. <https://doi.org/10.1186/s13063-022-06413-7>.
- Kelly, John R., Paul J. Kennedy, John F. Cryan, Timothy G. Dinan, Gerard Clarke, and Niall P. Hyland. 2015. "Breaking down the Barriers: The Gut Microbiome, Intestinal Permeability and Stress-Related Psychiatric Disorders." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9:392.
- Kooij, Karlijn L., Nadia Andrea Andreani, Luna L. Van Der Gun, Lara Keller, Stefanie Trinh, Benny Van Der Vijgh, Mienieke Luijendijk, et al. 2024. "Fecal Microbiota Transplantation of Patients with Anorexia Nervosa Did Not Alter Flexible Behavior in Rats." *International Journal of Eating Disorders*, June, eat.24231. <https://doi.org/10.1002/eat.24231>.
- Mack, Isabelle, Ulrich Cuntz, Claudia Grämer, Sabrina Niedermaier, Charlotte Pohl, Andreas Schwiertz, Kurt Zimmermann, Stephan Zipfel, Paul Enck, and John Penders. 2016. "Weight Gain in Anorexia Nervosa Does Not Ameliorate the Faecal Microbiota, Branched Chain Fatty Acid Profiles, and Gastrointestinal Complaints." *Scientific Reports* 6 (May):26752. <https://doi.org/10.1038/srep26752>.

- Prochazkova, Petra, Radka Roubalova, Jiri Dvorak, Jakub Kreisinger, Martin Hill, Helena Tlaskalova-Hogenova, Petra Tomasova, et al. 2021. "The Intestinal Microbiota and Metabolites in Patients with Anorexia Nervosa." *Gut Microbes* 13 (1): 1902771.
<https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1902771>.
- Schulz, Nina, Meriem Belheouane, Brigitte Dahmen, Vanessa A. Ruan, Hannah E. Specht, Astrid Dempfle, Beate Herpertz-Dahlmann, John F. Baines, and Jochen Seitz. 2021. "Gut Microbiota Alteration in Adolescent Anorexia Nervosa Does Not Normalize with Short-term Weight Restoration." *International Journal of Eating Disorders* 54 (6): 969–80.
<https://doi.org/10.1002/eat.23435>.
- Seitz, Jochen, Stefanie Trinh, and Beate Herpertz-Dahlmann. 2019. "The Microbiome and Eating Disorders." *Psychiatric Clinics of North America* 42 (1): 93–103.
<https://doi.org/10.1016/j.psc.2018.10.004>.
- Specht, Hannah E., Nina Mannig, Meriem Belheouane, Nadia Andrea Andreani, Klaus Tenbrock, Ronald Biemann, Katrin Borucki, et al. 2022. "Lower Serum Levels of IL-1 β and IL-6 Cytokines in Adolescents with Anorexia Nervosa and Their Association with Gut Microbiota in a Longitudinal Study." *Frontiers in Psychiatry* 13 (August):920665.
<https://doi.org/10.3389/fpsy.2022.920665>.