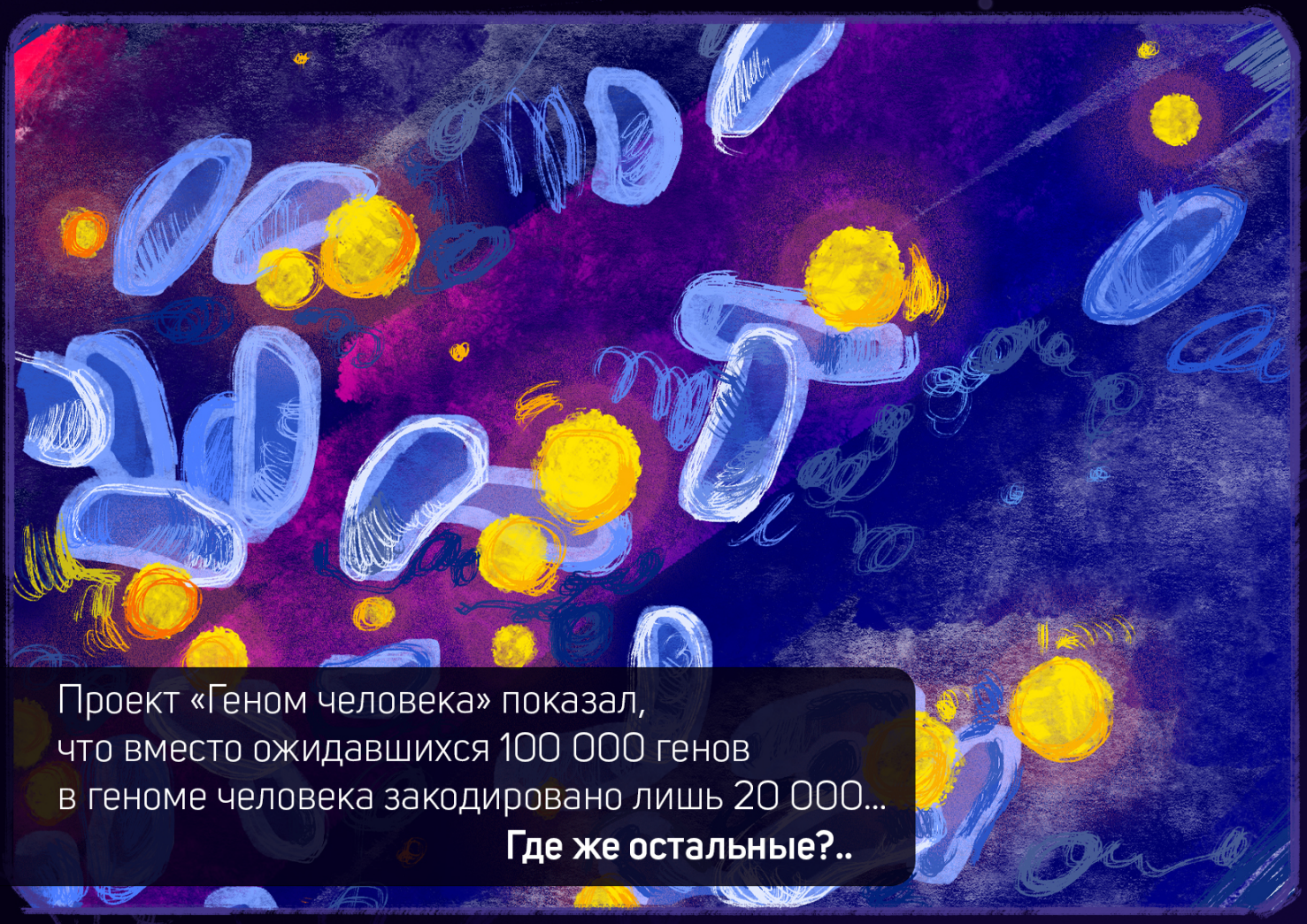
Магера Екатерина
Горохов Иван
Сергеев Александр
Петровская Ульяна

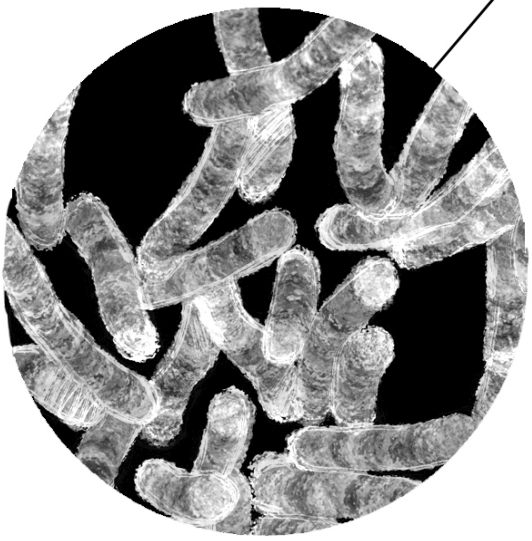
МИКРОБИОМ ЧЕЛОВЕКА

краткий обзор проекта



Проект «Геном человека» показал,
что вместо ожидавшихся 100 000 генов
в геноме человека закодировано лишь 20 000...
Где же остальные?..

Санкт-Петербург/2023



МИКРОБИОМ ЧЕЛОВЕКА

КРАТКИЙ ОБЗОР ПРОЕКТА

Магера Екатерина

Горохов Иван

Сергеев Александр

Петровская Ульяна

Санкт-Петербург/2023

Содержание

1. Введение 1

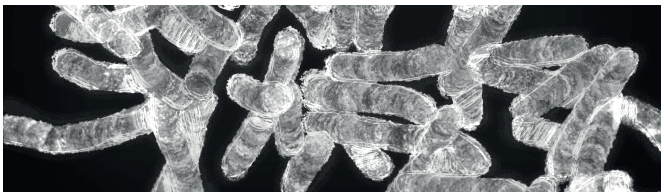
2. Метагеномика и её основные методы 3

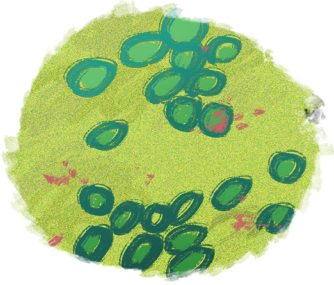
3. Начало проекта 8

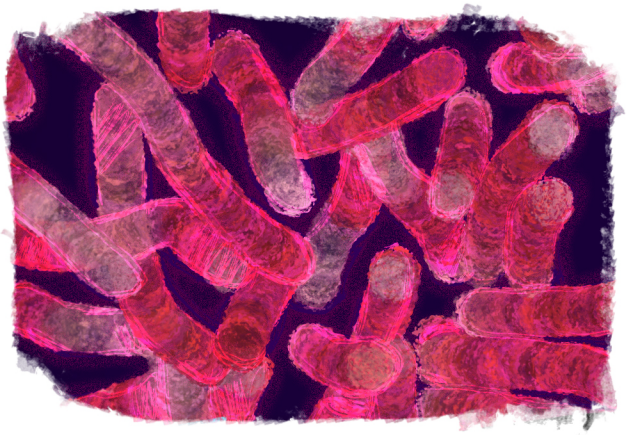
4. Основные результаты 9

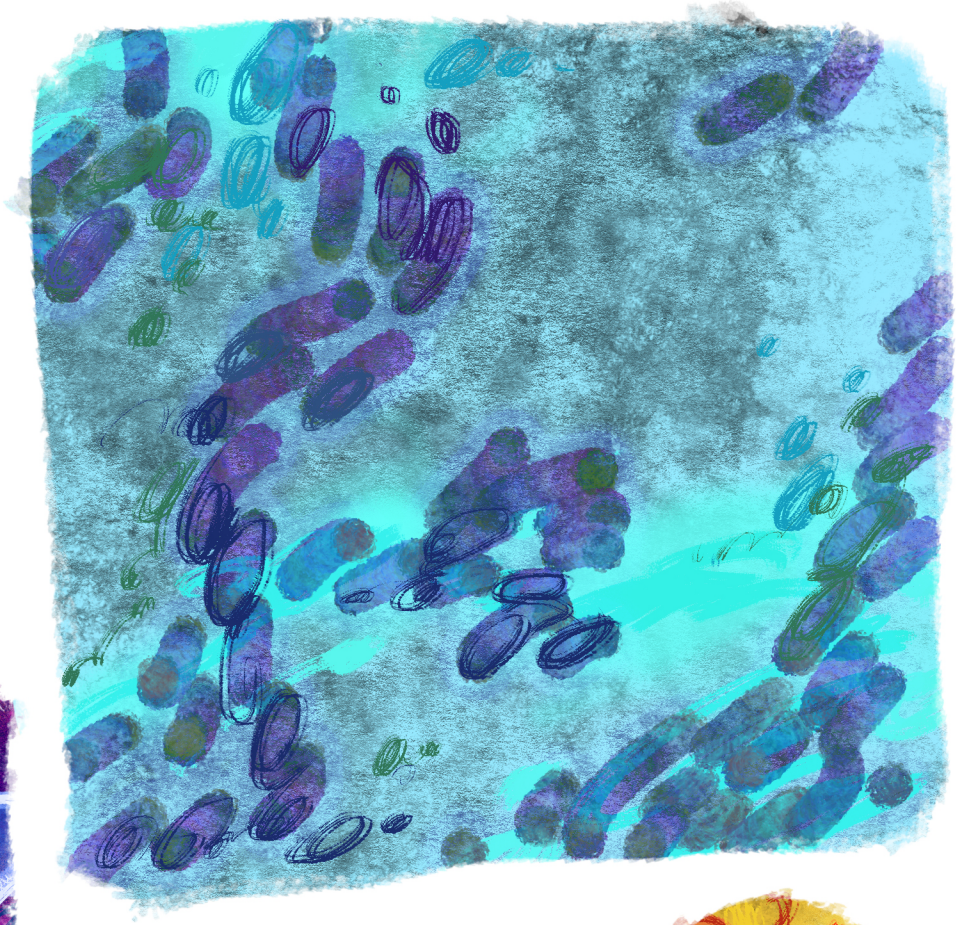
5. Выводы 13

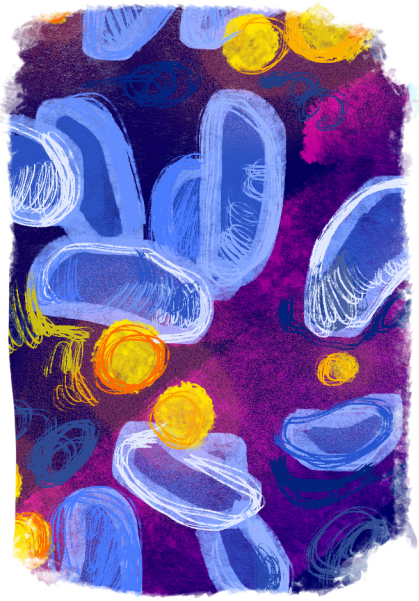
6. Список литературы 15

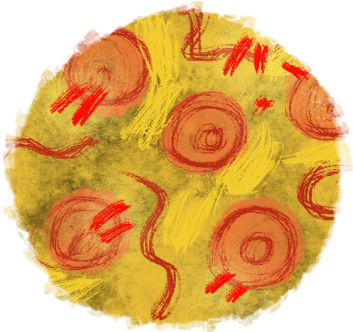












Введение

Благодаря эволюции и разнообразию условий на нашей планете за миллиарды лет жизни на ней живые организмы выработали многие адаптивные механизмы. В том числе, приспосабливаясь к среде обитания, животные, грибы, растения и прокариоты взаимодействовали друг с другом и формировали симбиотические отношения. В качестве примера симбиотических отношений чаще всего приводят микоризу - симбиоз высших растений и грибов. Ещё один пример симбиотических отношений - это ассоциация растений семейства Бобовых и азотфиксирующих бактерий рода *Azotobacter,* населяющих специальные органы растений - клубеньки.

Постепенно образовывались сообщества, представляющие собой устоявшуюся систему многих живых организмов. Для сообществ, состоящих из микробов, есть отдельное название – микробиота. Микробиота состоит из бактерий и архей, а также микроскопических представителей эукариот. Существует ещё один важный для современной микробиологии термин – микробиом[1]. Он обозначает совокупность всех геномов микробиоты. Часто термин "микробиом" используют в качестве синонима для микробиоты или микрофлоры, однако в рамках нашего обзора мы будем разделять эти два термина для ясности изложения (рис. 1).

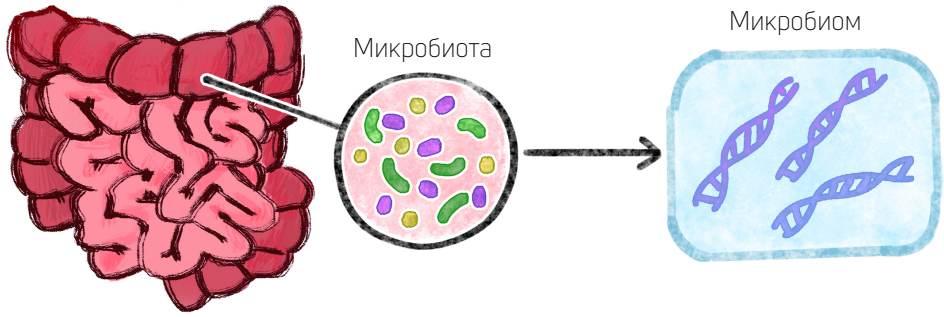


Рисунок 1. Разница терминов «микробиота» и «микробиом»

Методы молекулярной биологии, разработанные за последние 20-30 лет, позволяют изучать микробиоту и микробиомы в самом широком смысле: теперь мы знаем, какие микроорганизмы обитают в вечной мерзлоте[2], на экране телефона[3], на древних памятниках[4] и скульптурах[5]. Конечно, возможность изучить состав и структуру микробных сообществ, населяющих кожу и внутренние органы человека, была использована вскоре после появления необходимых для этого технологий. Так появился проект, ставший своего рода преемником проекта "Геном человека", – "Микробиом человека", о котором и пойдет речь.

Но почему изучение микробиома так важно?

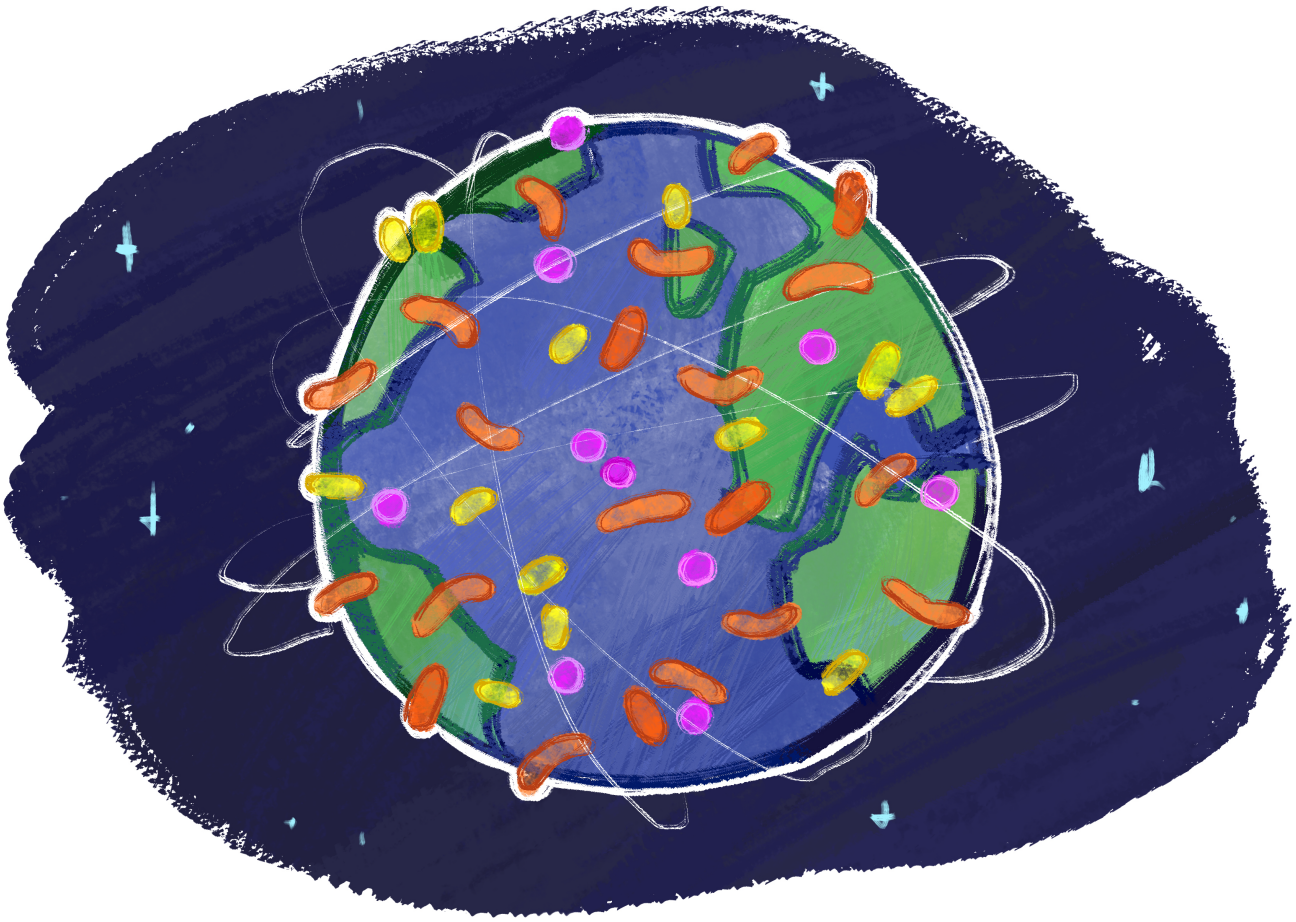
Во-первых, микробиота играет ключевую роль в поддержании здоровья человека и других млекопитающих. Уже в 1885 году Луи Пастер рассуждал о создании модельных организмов, не содержащих никаких микробов, но считал,

что жизнь такого организма невозможна. Тем не менее, через десять лет в Берлинском университете получили первых безмикробных морских свинок, которые прожили 13 дней. Ещё через пятьдесят лет, в сороковых годах XX века, были получены первые стерильные крысы, а в 1959 году и мыши[6]. Выяснилось, что, хотя жизнь таких организмов возможна, существует целый ряд отличий безмикробных животных от обычных. Например, у них наблюдается сниженное число лейкоцитов и антител, а чтобы поддерживать массу тела, безмикробным животным необходимо потреблять почти вдвое больше калорий. Кроме того, они более склонны к смерти от инфекций и аутоиммунных заболеваний. На иллюстрации приведены лишь некоторые из особенностей безмикробной особи[7] (рис. 2).

Рисунок 2. Особенности безмикробной мыши

Во-вторых, изучение микробиома помогает понять, как образ жизни хозяина может влиять на его микробиоту и, как следствие, на здоровье человека. Микробиота - это динамичная структура, которая изменяется под действием разнообразных факторов: возраста, уровня стресса, условий обитания и других[8]. Имея представление о строении и функционировании микробиома и микробиоты, можно использовать эти знания для создания новых подходов в диагностике, лечении и профилактике заболеваний человека.

В-третьих, микробиом сам по себе является живым свидетельством многовековой коэволюции человека и микробных сообществ. У человека есть множество адаптаций к микробиоте, которые помогают поддерживать его здоровье. Так, человеческий организм обеспечивает оптимальные условия для жизни полезных микроорганизмов, например, предоставляя питательные вещества, необходимые для их роста и размножения. Кроме того, иммунная система человека развивается в тесной взаимосвязи с микробиомом, что помогает контролировать количество и виды микробов в организме. С другой стороны, микробиота также адаптируется под рацион, режим дня и другие особенности жизни человека.



II Метагеномика и её основные методы

Бактерии распространены на нашей планете повсюду: в почве, в воздухе, в морях и океанах, в других живых организмах. Грубая оценка общего количества отдельных бактерий – 10^{28} - 10^{29} клеток[9].

К сожалению, столь великое биоразнообразие бактерий долгое время было недоступно для изучения. Согласно современным оценкам, на текущий момент изучено менее 1% от общего видового разнообразия бактерий[10]. Остальные 99% до недавнего времени оставались невидимками, будучи некультивируемыми. И, хотя их можно обнаружить с помощью методов метагеномики, этого недостаточно для полноценного изучения существующего микробиологического разнообразия. Метагеномика - это наука, изучающая прокариотическое биоразнообразие на генетическом уровне[11,12]. Цель метагеномного исследования – оценка генетического или видового разнообразия микроорганизмов в окружающей среде. Однако для исследования метаболизма бактерии или ее взаимоотношений с другими микробами метагеномики недостаточно, необходимо выделить изучаемую бактерию в чистую культуру. Чистая культура - это культура микроорганизмов, принадлежащих только к одному виду. Для некультивируемых бактерий воссоздать искусственно среду для роста невозможно.

Метагеномные исследования - это перспективная область молекулярной биологии и микробиологии. Среди неисследованного разнообразия прокариот могут скрываться продуценты ферментов и антибиотиков[13], полезных для развития промышленности, медицины и науки. Метаболические свойства некоторых бактерий можно использовать для улучшения роста сельскохозяйственных культур[14], а также биодеградации пластика[15] (рис.3).

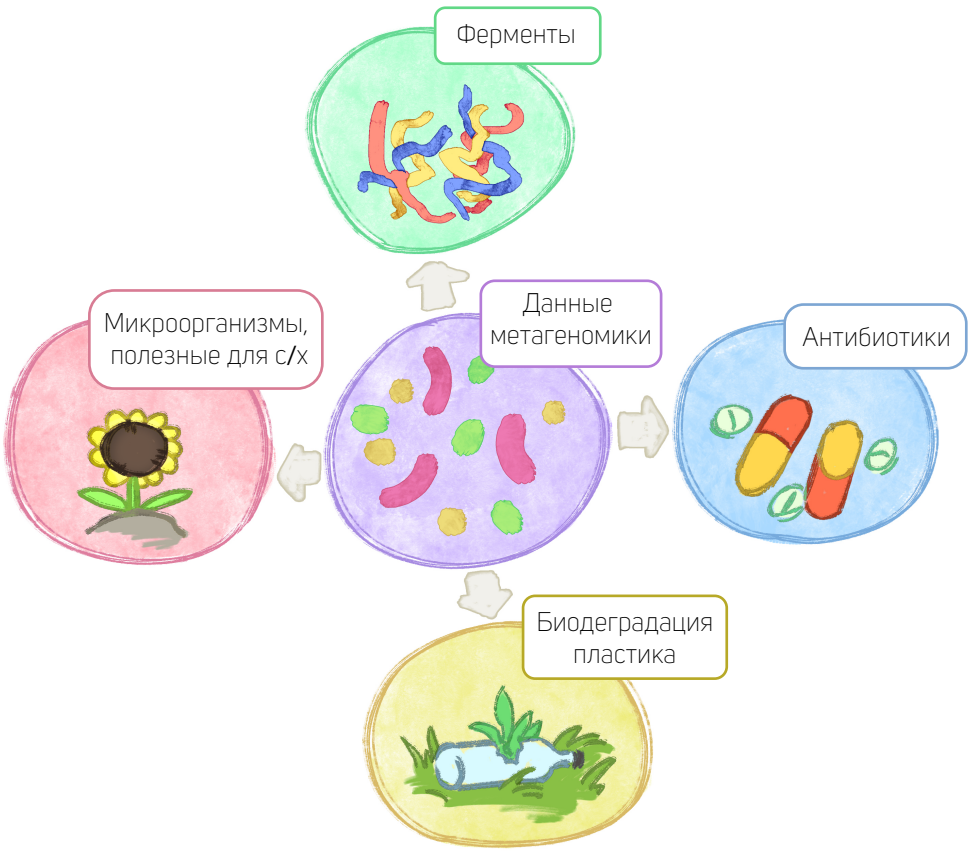


Рисунок 3. Полезное применение данных метагеномики

Методы метагеномики позволяют оценить видовое и генетическое разнообразие микроорганизмов, населяющих определённую среду. Поскольку основной целью проекта «Микробиом человека» была оценка видового состава микробиоты человека и описание микробиома, метагеномные методы стали ключевыми для работы над проектом. Мы сочли важным рассказать о них более подробно в нашем кратком обзоре проекта.

Метагеномное исследование начинается с того, что ученым в руки попадает проба, взятая из окружающей среды (это может быть проба воды из озера, несколько граммов почвы, кала или ткани животного). Далее из пробы выделяют тотальную ДНК (это может быть как внутриклеточная ДНК, так и внеклеточные нуклеиновые кислоты). Методами секвенирования следующего поколения (Next Generation Sequencing, NGS) осуществляют прочтение полученных последовательностей ДНК. В дальнейшем их анализируют с помощью биоинформатических методов. На основании полученных данных определяют видовое

разнообразие микроорганизмов в исследуемой пробе, эти результаты экстраполируют на среду, откуда была взята данная проба (рис. 4).

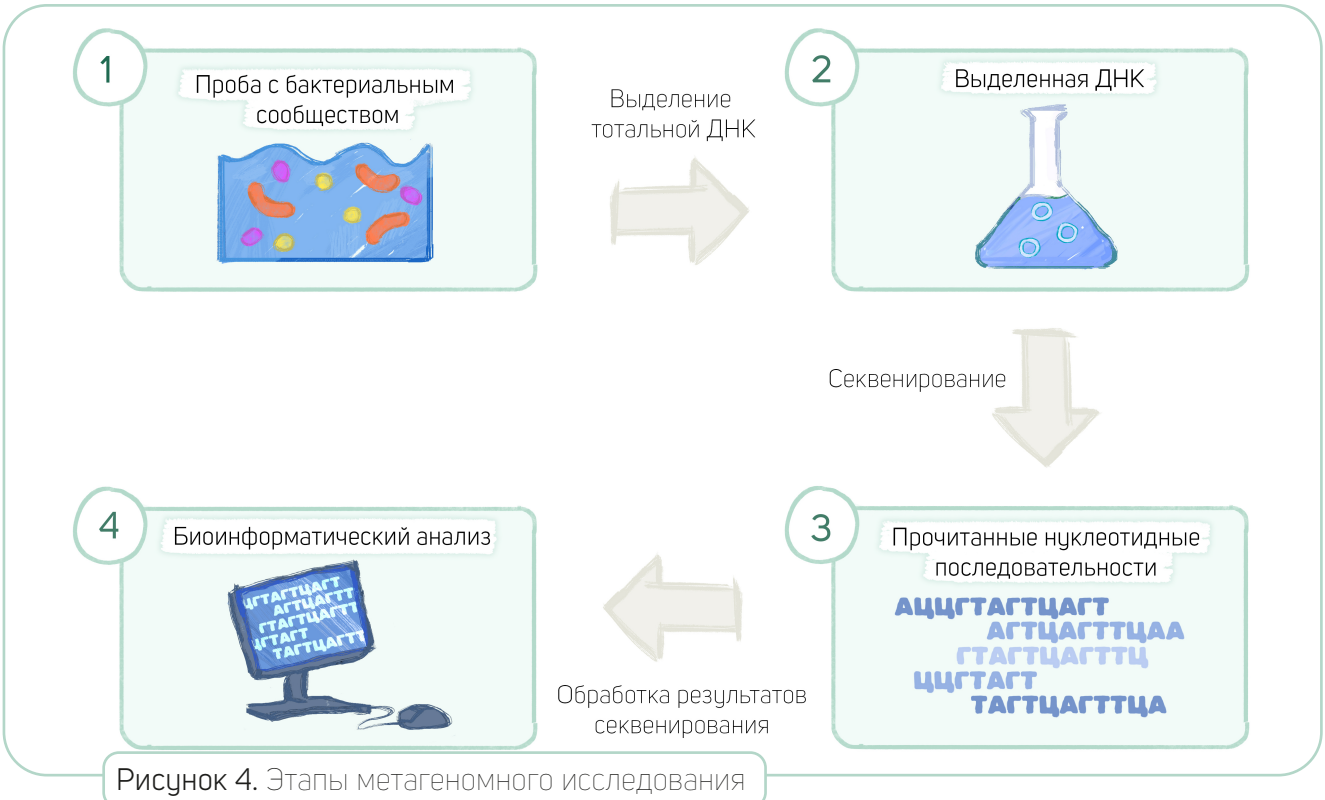


Рисунок 4. Этапы метагеномного исследования

Выделяют три подхода метагеномного исследования, которые влияют на пробоподготовку перед секвенированием:

1. **Секвенирование методом дробовика** (shotgun sequencing)[16]: тотальный экстракт ДНК фрагментируют случайным образом. Случайность фрагментации крайне важна для последующей сборки полученных геномов, потому что процесс сборки происходит по перекрывающимся участкам фрагментов геномной ДНК. Классическим способом фрагментации ДНК является обработка ультразвуком.

Далее на концы полученных фрагментов присоединяют адаптеры с известной нуклеотидной последовательностью. К ним будут подобраны праймеры для ПЦР (короткие нуклеотидные последовательности, комплементарно подобранные к известным участкам генома для умножения неизвестного целевого фрагмента перед его секвенированием), и фрагменты будут амплифицированы и секвенированы методами секвенирования следующего поколения (рис.5).

Данным методом можно получить полногеномные прочтения микроорганизмов без необходимости их выделения из естественной среды. Это полезно, когда целью исследования является характеристика видового разнообразия внутри изучаемой пробы, биохимических, физиологических и молекулярно-генетических свойств микроорганизмов в исследуемой среде без выделения их в чистую культуру. Более того, с помощью этого метода можно изучать распространенность одного или нескольких генов в популяции некультивируемых микроорганизмов.

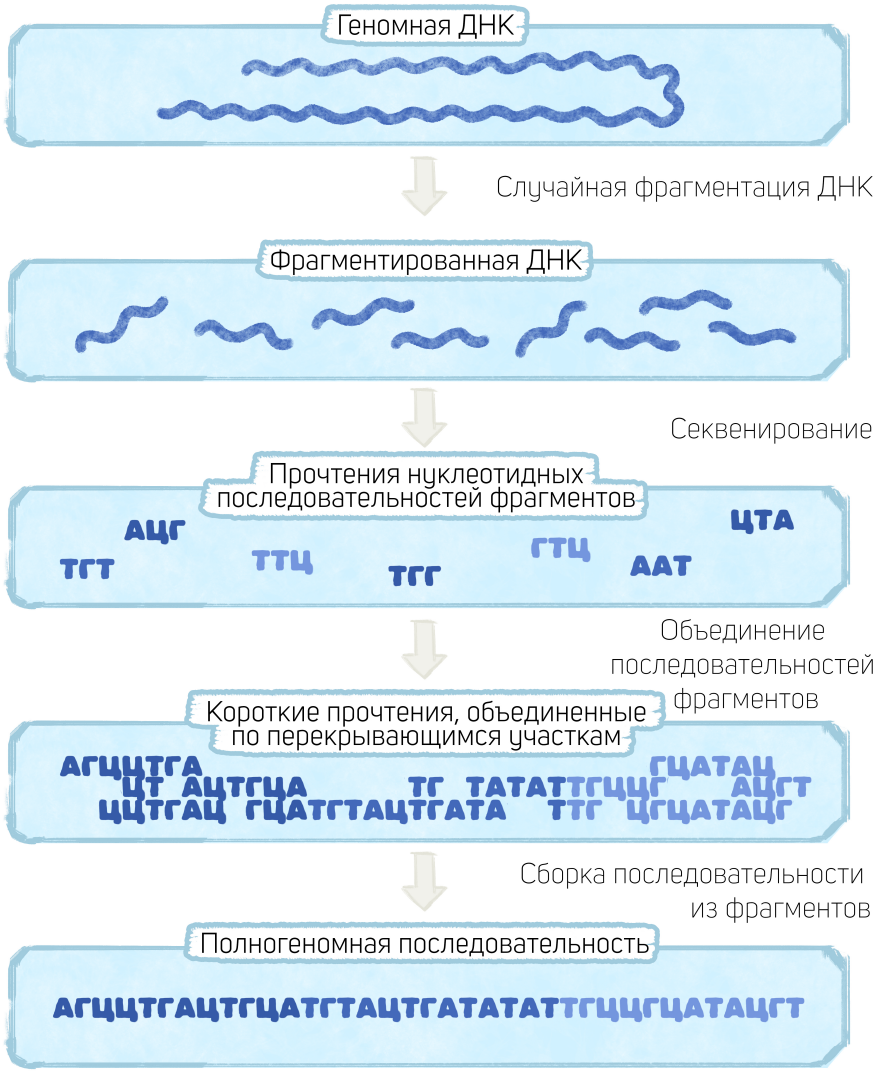


Рисунок 5. Схема секвенирования методом дробовика

2. Таргетное секвенирование (targeted sequencing): этот метод используется для прочтения не полной последовательности генома исследуемых микроорганизмов, а лишь отдельных его участков[17]. Ген 16s рРНК – высококонсервативная последовательность в геноме бактерий длиной около 1 500 пар нуклеотидов, содержащая информацию об аминокислотной последовательности белка в составе малой субъединицы рибосомы.

При таргетном секвенировании после выделения тотальной ДНК фрагментацию проводить не нужно. Следующим этапом будет амплификация с помощью ПЦР целевого участка генома. В случае гена 16s рРНК праймеры для амплификации подбираются к высококонсервативным участкам последовательности, так как они уже известны. В результате мы так же получаем достаточно короткие фрагменты ДНК, которые будут секвенированы (рис. 6).

Данный метод используется для идентификации видового состава микробного сообщества исследуемой пробы. Поскольку ген 16s рРНК обладает крайне низкой изменчивостью, то по отличиям нуклеотидной последовательности

этого гена изучаемой бактерии от уже известных последовательностей можно судить о положении исследуемого вида на филогенетическом дереве. Сходства ниже 97,5% последовательностей этого гена у двух бактерий достаточно, чтобы говорить об их принадлежности к разным видам[18].

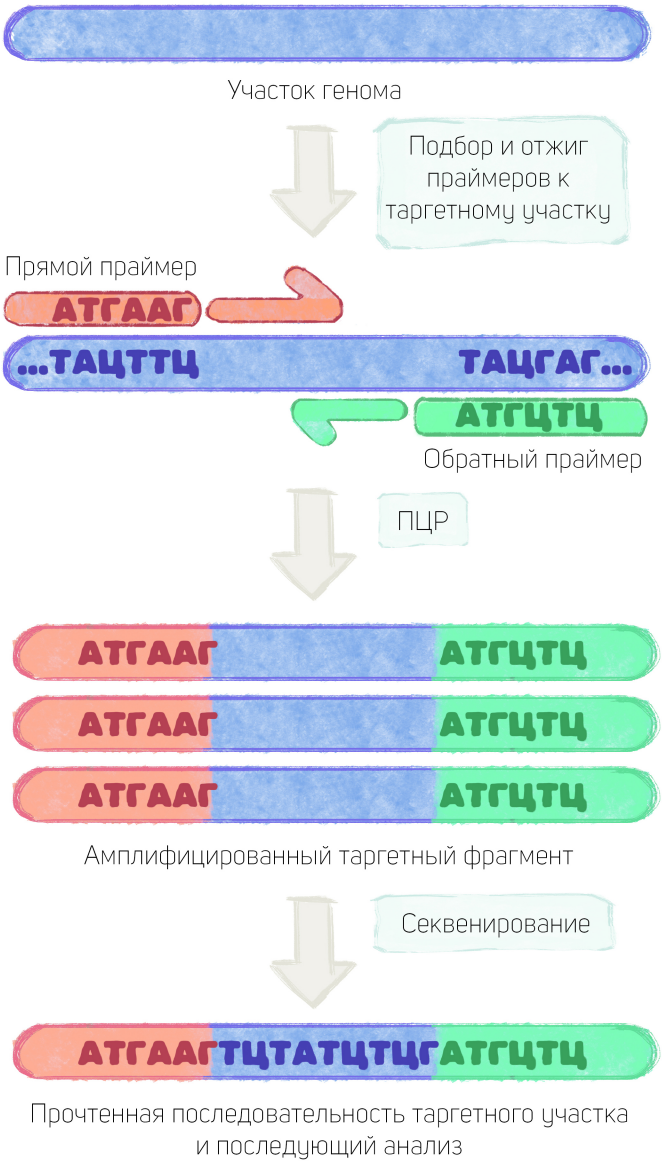


Рисунок 6. Схема таргентного секвенирования

3. Секвенирование с помощью нанопоры (Oxford Nanopore Technologies, ONT)[19]: этот метод, в отличие от перечисленных выше, не требует амплификации ДНК, а секвенирует отдельные длинные молекулы. Поэтому ONT относят к методам секвенирования третьего поколения (Third Generation Sequencing, TGS) (рис. 7).

По результатам секвенирования методами NGS получают короткие прочтения случайных фрагментов генома. Из этих фрагментов собирают целые геномные последовательности в случае shotgun-секвенирования или участки генома при таргетном секвенировании. При секвенировании на нанопоре осуществляются прочтения более длинных фрагментов геномной ДНК. Полученные результаты используют для последующего биоинформатического анализа: сборки полногеномных последовательностей, определения положений

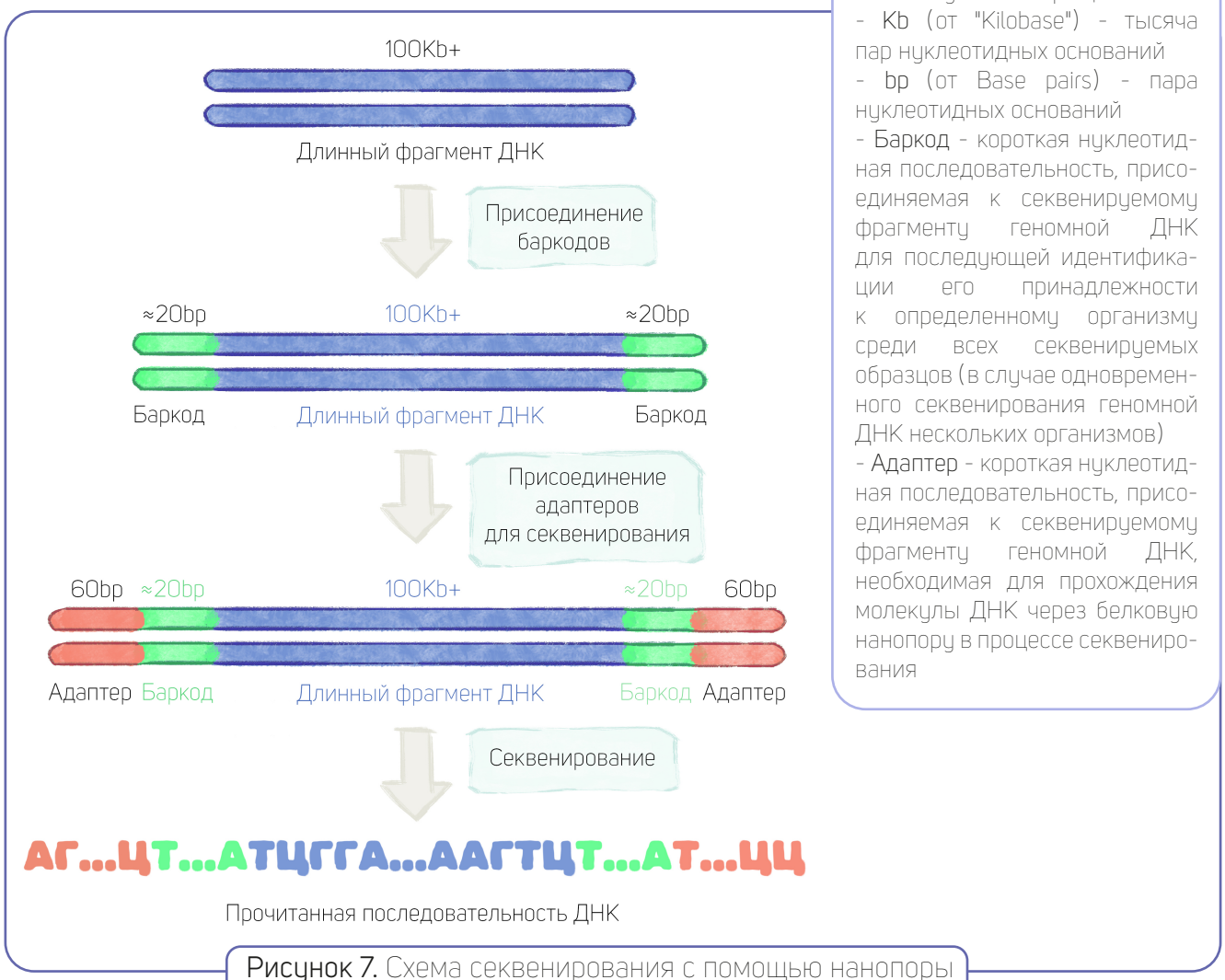


Рисунок 7. Схема секвенирования с помощью нанопоры

исследуемых бактерий на филогенетическом дереве, то есть принадлежности к определенному таксону или наиболее родственных видов, аннотаций геномов (предсказания функции генов внутри полученных геномов).

Начало проекта

Перед завершением Проекта Генома Человека (Human Genome Project, HGP)[20] ученые предсказывали существование около 100 000 генов внутри человеческого генома. Результаты HGP показали, что генов, кодирующих белки, в геноме человека содержится лишь около 20 000. Однако, если рассматривать человека вместе со всеми населяющими его микробами, начиная с поверхности кожи и заканчивая полостью кишечника, то оценка в 100 000 генов окажется слишком заниженной. Количество микробных клеток внутри человека превосходит количество человеческих клеток. Симбиотические микроорганизмы человека оказывают влияние на его биохимические, физиологические, поведенческие и другие особенности.

Для изучения полного генетического разнообразия человека стала очевидной необходимость в характеристике ассоциированной с организмом хозяина микробиоты, а также факторов, определяющих ее состав и эволюцию. Это и стало основным поводом для старта Проекта Микробиома Человека (Human Microbiome Project, HMP)[21].

Проект Микробиом Человека был запущен Национальными институтами здоровья (National Institutes of Health, NIH) в 2007 году. Изначально поставленной задачей была характеристика микробных сообществ как минимум из 4 областей тела человека: из желудочно-кишечного тракта, рта, влагалища и с поверхности кожи. Одной из главных целей исследований была характеристика микробиома человека для возможности изучения его зависимости от заболеваний, возраста, питания, принимаемых лекарств и окружающей среды. Не менее важной целью была и оценка влияния микробиома на развитие заболеваний.

Первая фаза Проекта, начавшаяся в 2007 году, включала в себя секвенирование пятисот новых референсных бактериальных геномов, выделенных из разных органов и тканей человеческого тела, а также составление протоколов для забора проб от волонтеров и последующего 16s рРНК секвенирования[22].

В 2009 году более пятисот бактериальных геномов изучались центрами секвенирования. Около 375 геномов находились на стадии подготовки к депонированию или уже были загружены в GenBank - общедоступную базу данных, содержащую последовательности ДНК или РНК, их аннотации, аминокислотные последовательности белков. Были созданы четыре научные группы для изучения микробиомов из предложенных органов и тканей человеческого тела[23].

В следующей фазе HMP была продолжена работа по созданию референсных баз данных, начавшаяся на первом этапе проекта. Также были запланированы специальные демонстрационные проекты для изучения корреляции изменений микробиома и наличия каких-либо заболеваний у человека.

IV Основные результаты

Несмотря на то, что о проекте "Геном человека" слышал практически каждый, далеко не все осведомлены с исследованиями проекта "Микробиом человека". Поскольку основные результаты данного проекта являются не менее значимыми для научного общества и общества в целом, важно подчеркнуть актуальность и ценность исследований HMP.

Научные сотрудники по всему миру решили объединить усилия с целью создания и развития единых баз данных для структуризации и упорядочения полученной в ходе исследования информации. Наибольшее развитие получила система Интегрированной базы данных микробных геномов (The Integrated Microbial Genomes database, IMG). Исследователи стали активно делиться знаниями о полинуклеотидных последовательностях геномов представителей всех трёх доменов жизни (Архей, Прокариот и Эукариот). Это позволило другим научным сотрудникам проводить сравнительный полногеномный анализ[24].

Помимо IMG актуализировались и другие базы данных и Интернет-ресурсы, например, база данных биохимически охарактеризованных белков (The Characterized Protein Data Base, CharProtDB) и ресурс с доступом к информации о состоянии геномных и метагеномных проектов по всему миру (The Genomes OnLine Database)[25,26].

Кроме того, учёными были оптимизированы инструменты, необходимые для выделения и распознавания общих закономерностей в массивных наборах данных. Среди ярких примеров таких инструментов выделяются инструмент поиска сходства белковых молекул для данных NGS-секвенирования (Reduced Alphabet based Protein similarity Search, RAPSearch2), веб-ресурс для выравнивания РНК-последовательностей (Boulder ALignment Editor, ALE), а также веб-сервер, предназначенный для быстрого и эффективного анализа метагеномных последовательностей (Web Server for fast Metagenomic Sequence Analysis, WebMGA)[27-29].

Как уже было сказано ранее, одной из главных задач проекта была характеристика микробиома человека следующих областей тела: ЖКТ, ротовой полости, влагалища и поверхности кожи. Выявление факторов, оказывающих влияние на структуру и функциональную активность микробного сообщества, позволило бы улучшить понимание роли микробиома в поддержании здорового состояния человека[22].

Один из таких факторов – локализация и пространственная организация сообщества микроорганизмов. Например, при помощи метагеномного анализа с использованием NGS-секвенирования исследователи установили, что микробиота не имеет фиксированного расположения в модели кишечника человека и может меняться в течение жизни. Также при помощи метагеномных методов было продемонстрировано неупорядоченное расположение отдельных консорциумов бактерий, что отражает многочисленные межклеточные контакты

и сложные метаболические взаимодействия между микроорганизмами[30].

Несмотря на наблюдаемое изменение пространственного расположения микробиоты во времени, микроорганизмы не могут свободно перемещаться по телу человека. Более того, попадание бактерий-комменсалов в нетипичные для своего местообитания ткани или органы может приводить к развитию не только органоспецифичного аутоиммунного ответа организма-хозяина, но и системного. Например, исследователями было показано, что проникновение одиночных бактерий *Enterococcus gallinarum* в печень и в селезёнку вызывает волчаночноподобный аутоиммунитет[31].

Помимо неправильной локализации и пространственной организации микробиоты на развитие заболеваний человека также может оказать влияние и изменение численности микроорганизмов. При помощи методов метапротеомики и метаболомики (изучение образца среды, характеризующейся наличием представителей разных видов микроорганизмов, соответственно на уровне белка и продуктов обмена веществ) было продемонстрировано, что сокращение количества комменсалов кишечника, особенно представителей типов *Firmicutes* и *Bacteroidetes*, приводит к развитию воспалительного заболевания кишечника (ВЗК)[32] (рис. 8).

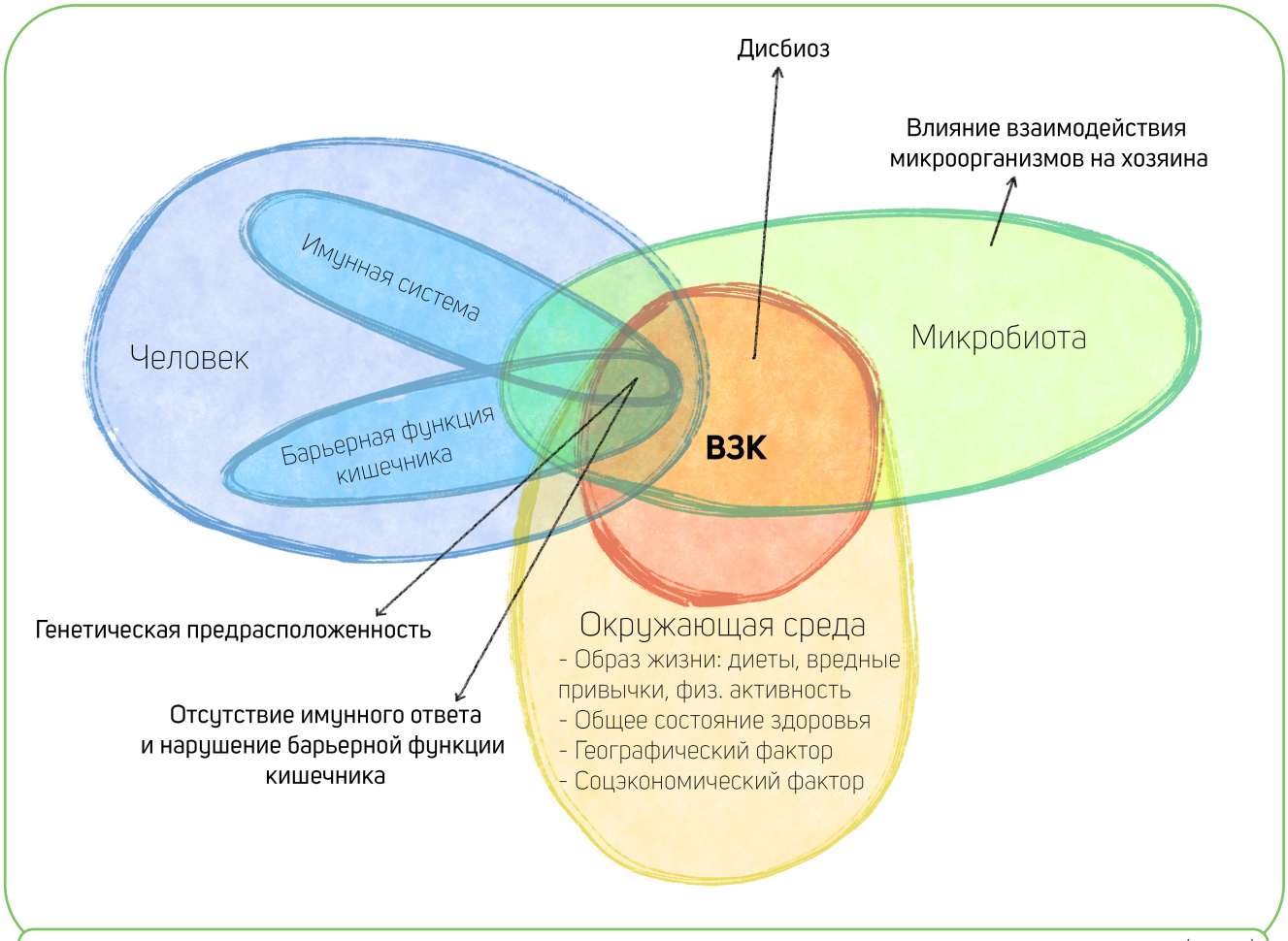


Рисунок 8. Факторы, влияющие на развитие воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК)

Ещё одним достижением проекта можно считать построение цепей важных молекулярных и клеточных взаимодействий хозяина и микробов, в том числе при развитии заболеваний человека. Например, исследователи определили более чем 2 900 подобных взаимодействий, нарушение которых может привести к развитию ВЗК[23].

Ключевой результат HMP - это отображение двусторонней взаимосвязи системы микробиота-хозяин. Было показано, что не только изменение свойств микробиоты определяет состояние здоровья человека, но и сам человек может влиять на структуру и функциональную активность микробного сообщества. Научные сотрудники продемонстрировали следующее: изменение диеты (снижение растительных волокон и повышение количества жиров в рационе питания) и ухудшение качества сна негативно воздействуют на циркадный ритм

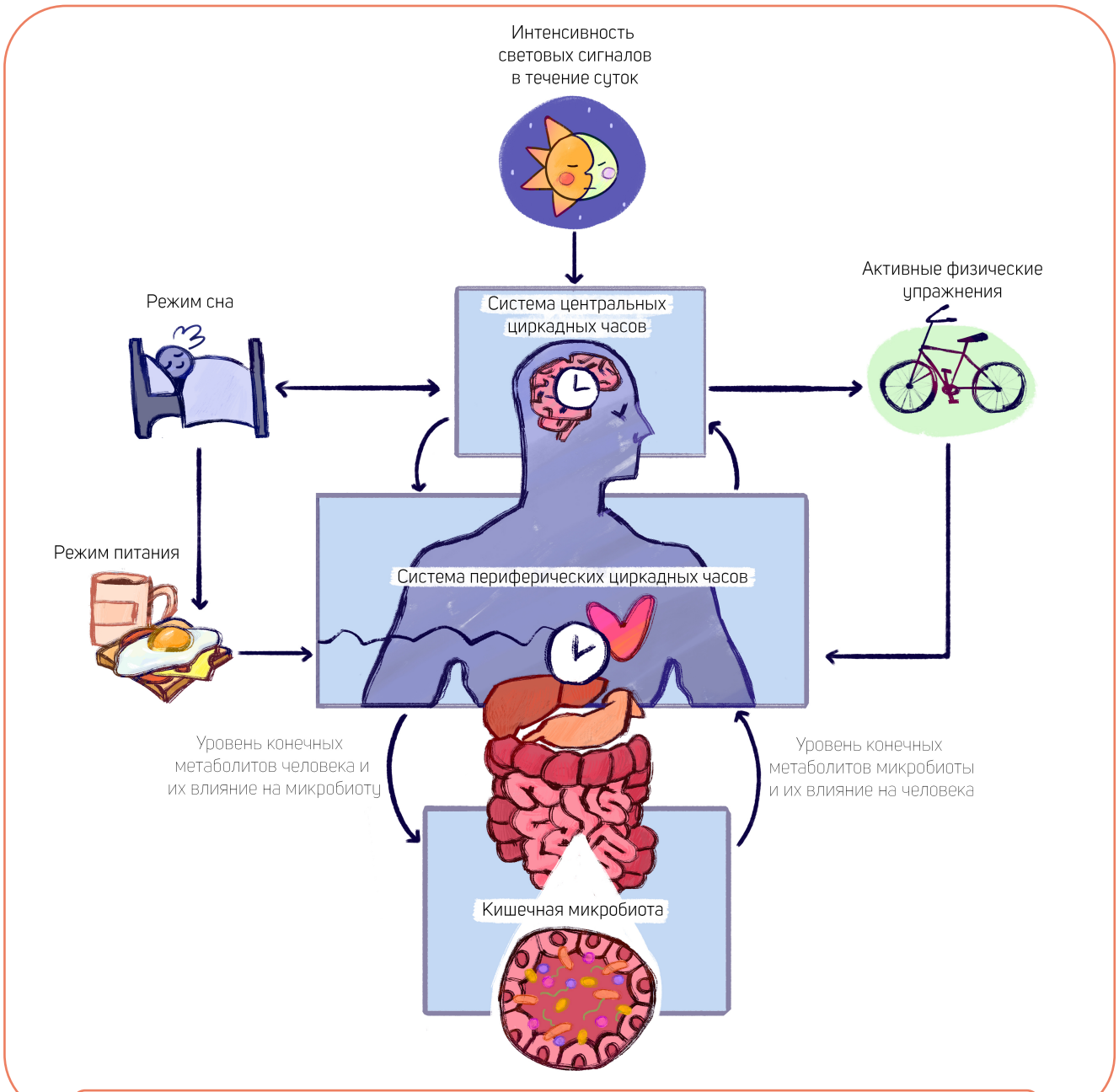


Рисунок 9. Синхронизация циркадных ритмов человека и микробиоты кишечника

микробиоты. Поскольку циркадный ритм микробного сообщества синхронизирован с циркадным ритмом хозяина, его нарушение может привести к изменениям метаболизма и, как следствие, жизнедеятельности человека, например, к развитию ожирения или ВЗК[33] (рис. 9).

Исследователи НМР проводили и совершенно необычные научные работы. Были предприняты попытки изучения вопроса уникальности человеческого микробиома. Было установлено, что метагеномные коды кишечной микробиоты человека являлись относительно стабильными и точно определяли более 80 процентов людей, а несоответствие кода своему владельцу объяснялось потерей специфических микробных штаммов[34].

Ученые также изучили компоненты клеточных покровов и внеклеточного матрикса ассоциированного микробиотического сообщества. В ходе исследования липополисахаридов и сфинголипидов оболочек микроорганизмов, белков жгутика, а также компонентов биопленок (в том числе, амилоидов) была подтверждена их чужеродность и потенциальная иммуногенность для иммунной системы человека[22].

Наконец, в рамках проекта изучали гены прокариотов, позволяющие им быть устойчивыми к воздействию антибиотиков. Исследования подтвердили, что в образцах фекалий здоровых людей из разных стран содержались бактерии с генами устойчивости к наиболее распространённым антибиотикам: тетрациклину и макролидам.[35]

V Выводы

Исследования проекта “Микробиом человека” были настолько разносторонними, что сложно подвести один универсальный итог для всех. Тем не менее, можно выделить пять широких тем проекта: специфические взаимодействия между микроорганизмами внутри микробного сообщества, а также между крупными сообществами, роль конкретного микроба в микробном сообществе, роль микробных продуктов и изучение биоплёнок (сообществ бактерий в выделяемом ими внеклеточном матриксе)[22] (рис. 10).

Рисунок 10. Пять ключевых тем проекта, получивших своё развитие ввиду применения трёх основных инструментов HMP (Human Microbiome Project)

Результаты проекта “Микробиом человека” остаются актуальными в настоящее время. Так, полученные в ходе исследований HMP знания структуры и пространственной организации микробиоты обеспечивают более глубокое понимание основ симбиотических отношений с хозяином, в том числе на уровне физических и молекулярных взаимодействий. Нарушения данной двусторонней связи зачастую приводит к развитию заболеваний, что может использоваться для соответствующей диагностики[32]. Кроме того, диагностика может быть направлена на подтверждение отсутствия терапевтического эффекта используемых методов лечения, например, антибактериальными препаратами ввиду распространенности генов устойчивости к антибиотикам в микробиоме[35].

В свою очередь, полученная информация может быть также применима для усовершенствования режима питания и сна[33], разработки новых или изменения уже существующих методов лечения заболеваний человека[30]. В том числе, результаты проекта могут обеспечить более достоверный поиск мишени для разработки терапевтического препарата, направленного на лечение уже имеющегося заболевания[23].

Роль микробиома в жизни организма-хозяина, в частности человека, тяжело переоценить. Исследования ассоциированной микробиоты человека, начало которым было положено в 2007, продолжаются до сих пор. Результаты первых этапов HMP остаются актуальными и по сей день, и каждый год ученые получают новые знания, приоткрывающие завесу тайны взаимодействий между человеком и его симбиотическими микроорганизмами.

Список литературы

1. Елена Головина. Микробиом кишечника: мир внутри нас, Биомолекула, 2016.

2. Mackelprang, R. et al. Metagenomic analysis of a permafrost microbial community reveals a rapid response to thaw. Nature 480, 368–371 (2011).

3. Olsen, M. et al. A pilot metagenomic study reveals that community derived mobile phones are reservoirs of viable pathogenic microbes. Sci. Rep. 11, 14102 (2021).

4. Delegou, E. et al. METAGENOMICS OF THE BUILT CULTURAL HERITAGE: MICROBIOTA CHARACTERIZATION OF THE BUILDING MATERIALS OF THE HOLY AEDICULE OF THE HOLY SEPULCHRE IN JERUSALEM. (2022) doi:10.5281/ZENODO.5772545.

5. Piñar, G., Poyntner, C., Tafer, H. & Sterflinger, K. A time travel story: metagenomic analyses decipher the unknown geographical shift and the storage history of possibly smuggled antique marble statues. Ann. Microbiol. 69, 1001–1021 (2019).

6. Luczynski, P. et al. Growing up in a Bubble: Using Germ-Free Animals to Assess the Influence of the Gut Microbiota on Brain and Behavior. Int. J. Neuropsychopharmacol. 19, pyw020 (2016).

7. Kostic, A. D. The human microbiome: A coming of age story. Cell Host Microbe 30, 449–453 (2022).

8. Gerber, G. K. The dynamic microbiome. FEBS Lett. 588, 4131–4139 (2014).

9. Flemming, H.-C. & Wuertz, S. Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. Nat. Rev. Microbiol. 17, 247–260 (2019).

10. Zhang, X.-H., Ahmad, W., Zhu, X.-Y., Chen, J. & Austin, B. Viable but nonculturable bacteria and their resuscitation: implications for cultivating uncultured marine microorganisms. Mar. Life Sci. Technol. 3, 189–203 (2021).

11. Sleator, R. D., Shortall, C. & Hill, C. Metagenomics. Lett. Appl. Microbiol. 47, 361–366 (2008).

12. Анна Дукат. Микробные фармацевты внутри нас. Человеческий микробиом — спаситель и убийца, Биомолекула, 2019.

13. Bashir, Y., Pradeep Singh, S. & Kumar Konwar, B. Metagenomics: An Application Based Perspective. Chin. J. Biol. 2014, 1–7 (2014).

14. Babalola, O. O. Beneficial bacteria of agricultural importance. Biotechnol. Lett. 32, 1559–1570 (2010).

15. Urbanek, A. K., Rymowicz, W. & Mirończuk, A. M. Degradation of plastics and plastic-degrading bacteria in cold marine habitats. Appl. Microbiol. Biotechnol. 102, 7669–7678 (2018).

16. Motahari, A. S., Bresler, G. & Tse, D. N. C. Information Theory of DNA Shotgun Sequencing. IEEE Trans. Inf. Theory 59, 6273–6289 (2013).

17. Sabat, A. J. et al. Targeted next-generation sequencing of the 16S-23S rRNA region for culture-independent bacterial identification - increased discrimination of closely related species. Sci. Rep. 7, 3434 (2017).

18. Patel, J. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. Mol. Diagn. 6, 313–321 (2001).

19. Wang, Y., Zhao, Y., Bollas, A., Wang, Y. & Au, K. F. Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. Nat. Biotechnol. 39, 1348–1365 (2021).

20. Olson, M. V. The human genome project. Proc. Natl. Acad. Sci. 90, 4338–4344 (1993).

21. Turnbaugh, P. J. et al. The Human Microbiome Project. Nature 449, 804–810 (2007).

22. NIH Human Microbiome Portfolio Analysis Team. A review of 10 years of human microbiome research activities at the US National Institutes of Health, Fiscal Years 2007-2016. Microbiome 7, 31 (2019).

23. The Integrative HMP (iHMP) Research Network Consortium. The Integrative Human Microbiome Project. Nature 569, 641–648 (2019).

24. Markowitz, V. M. et al. IMG: the integrated microbial genomes database and comparative analysis system. Nucleic Acids Res. 40, D115–D122 (2012).

25. Madupu, R. et al. CharProtDB: a database of experimentally characterized protein annotations. Nucleic Acids Res. 40, D237–D241 (2012).

26. Pagani, I. et al. The Genomes OnLine Database (GOLD) v.4: status of genomic and metagenomic projects and their associated metadata. Nucleic Acids Res. 40, D571–D579 (2012).

27. Stombaugh, J., Widmann, J., McDonald, D. & Knight, R. Boulder ALignment Editor (ALE): a web-based RNA alignment tool. Bioinformatics 27, 1706–1707 (2011).

28. Wu, S., Zhu, Z., Fu, L., Niu, B. & Li, W. WebMGA: a customizable web server for fast metagenomic sequence analysis. BMC Genomics 12, 444 (2011).

29. Zhao, Y., Tang, H. & Ye, Y. RAPSearch2: a fast and memory-efficient protein similarity search tool for next-generation sequencing data. Bioinformatics 28, 125–126 (2012).

30. Caporaso, J. G. et al. Moving pictures of the human microbiome. Genome Biol. 12, R50 (2011).

31. Manfredo Vieira, S. et al. Translocation of a gut pathobiont drives autoimmunity in mice and humans. Science 359, 1156–1161 (2018).

32. Frank, D. N. et al. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. Proc. Natl. Acad. Sci. 104, 13780–13785 (2007).

33. Leone, V. et al. Effects of Diurnal Variation of Gut Microbes and High-Fat Feeding on Host Circadian Clock Function and Metabolism. Cell Host Microbe 17, 681–689 (2015).

34. Franzosa, E. A. et al. Identifying personal microbiomes using metagenomic codes. Proc. Natl. Acad. Sci. 112, (2015).

35. Seville, L. A. et al. Distribution of Tetracycline and Erythromycin Resistance Genes Among Human Oral and Fecal Metagenomic DNA. Microb. Drug Resist. 15, 159–166 (2009).