

**NUTRITION, PROBIOTICS AND PERIODIC DISEASE: DNA METHYLATION OF
COMMENSAL *Escherichia coli***

VARDAN TSATURYAN

Head of Military Medicine Faculty, Head of Military Therapy Department
Yerevan State Medical University
Doctor of Medical Sciences
vtsaturian@mail.ru

ELYA PEPOYAN

Researcher
Armenian National Agrarian University,
Division of Food Safety and Biotechnology
elyap@yandex.ru

MARINE BALAYAN

Senior researcher
Armenian National Agrarian University,
Division of Food Safety and Biotechnology
PhD in Biological Sciences
marine.balayan@gmail.com

ASTGHIK PEPOYAN

Head of the Division of Food Safety and Biotechnology
Armenian National Agrarian University
Doctor of Biological Sciences, Professor
apepoyan@gmail.com

Abstract

Keeping specific diets is one of the main points in managing many diseases. It is also known that the intake of certain food might provide predictable shifts in gut bacterial communities in diseases. On the other hand, probiotics are suggested to restore the unfavourable changes in gut microbiota. Moreover, food enriched with specific probiotics might be the basis of certain diets, but the selection of probiotics and its targeted delivery through food requires serious scientific-technological approaches to stimulate/keep the growth of probiotic through synbiotic nutrition.

Periodic disease /PD, FMF, familial Mediterranean fever/, the autosomal recessive and systemic autoinflammatory disorder, is characterized by recurrent bouts of fever, serositis, synovitis, and/or cutaneous inflammation. A low-salt/low-fat diet may be used in the management of PD patients. The exact role of intestinal bacteria is not yet fully understood, but the potential for host-microbiota dialogue is widely discussed in the pathogenesis of PD.

This study aimed to clarify whether the investigations on DNA methylation of gut commensal *E. coli* from FMF patients had actuality for evaluating host-microbiota dialogue.

The following keywords- *E. coli*, gut, FMF and DNA methylation were used to collect data from PubMed (1990-2021).

The analysis of the literature data substantiated the usefulness of the investigations on DNA methylation of gut commensal *E. coli* in FMF disease for the evaluation of host-microbiota dialogue.

Keywords and phrases

FMF, probiotic, *E. coli*, methylation, DNA, gut microbiota.

ՍՆՈՒՑՈՒՄ, ՊՐՈԲԻՈՏԻԿՆԵՐ ԵՎ ՊԱՐԲԵՐԱԿԱՆ ՀԻՎԱՆԴՈՒԹՅՈՒՆ՝ ԿՈՄԵՆՍԱԼ *Escherichia coli* –ՆԵՐԻ ԴՆԹ-ՄԵԹԻԼԱՑՈՒՄԸ

ՎԱՐԴԱՆ ԾԱՏՈՒՐՅԱՆ

ռազմաբժշկական ֆակուլտետի ղեկավար, Երևանի պետական բժշկական
համալսարանի ռազմական թերապիայի ամբիոնի վարիչ
բժշկական գիտությունների դոկտոր
vtsaturian@mail.ru

ԷԼՅԱ ՓԵՓՈՅԱՆ

Հայաստանի ազգային ագրարային համալսարանի սննդի անվտանգության և
կենսատեխնոլոգիայի բաժնի գիտաշխատող
elyap@yandex.ru

ՄԱՐԻՆԵ ԲԱԼԱՅԱՆ

Հայաստանի ազգային ագրարային համալսարանի սննդի անվտանգության և
կենսատեխնոլոգիայի բաժնի ավագ գիտաշխատող
marine.balayan@gmail.com

ԱՍՏԴԻԿ ՓԵՓՈՅԱՆ

Հայաստանի ազգային ագրարային համալսարանի սննդի անվտանգության և
կենսատեխնոլոգիայի բաժնի վարիչ
կենսաբանական գիտությունների դոկտոր, պրոֆեսոր
a pepoyan@gmail.com

Համառոտագիր

Հատուկ դիետաների պահպանումը/հաստատումը շատ հիվանդությունների
կառավարման հիմնական կետերից մեկն է: Հայտնի է նաև, որ որոշակի սննդա-

մթերքի ընդունումը կարող է հիվանդությունների ժամանակ աղիքային բակտերիալ համայնքներում առաջացնել կանխատեսելի տեղաշարժեր: Մյուս կողմից՝ պրոբիոտիկներն առաջարկվում են աղիների միկրոբիոտայի անբարենպաստ փոփոխությունները վերականգնելու համար: Ավելին՝ հատուկ պրոբիոտիկներով հարստացված սնունդը կարող է կարևոր հիմք հանդիսանալ որոշ դիետաների համար: Պրոբիոտիկի ընտրությունը, ինչպես նաև սննդի միջոցով պրոբիոտիկի նպատակային առաքումը, սակայն, պահանջում են լուրջ գիտատեխնիկական մոտեցումներ, որպեսզի սինբիոտիկ սնուցման միջոցով հնարավոր լինի պահպանել/խթանել նաև պրոբիոտիկ-բակտերիայի աճը:

Պարբերական հիվանդությունը (ՊՀ, PD, ընտանեկան միջերկրածովային տենդ), աուտոսոմալ ռեցեսիվ համակարգային ինքնաբորբոքային խանգարում է և բնութագրվում է ջերմության, սերոզիտի, սինովիտի և/կամ մաշկային բորբոքումների պարբերական նոպաներով: ՊՀ հիվանդության կառավարման համար հաջողությամբ կարող է ցածր աղային/յուղայնությամբ դիետա օգտագործվել: Աղիքային մանրէների ճշգրիտ դերը դեռ լիովին պարզ չէ, բայց ՊՀ պաթոգենեզում լայնորեն քննարկվում է տեր-միկրոբիոտա երկխոսության կարևորությունը: Այս ուսումնասիրությունը նպատակ ունի պարզելու ՊՀ հիվանդների աղիքային կոմենսալ *E. coli*-ների ԴՆԹ-ի մեթիլացման ուսումնասիրությունների արդիականությունը տեր-միկրոբիոտա երկխոսության գնահատման համար: PubMed-ից տվյալներ հավաքելու համար (1990-2021) օգտագործվել են հետևյալ հիմնաբառերը՝ *E. coli*, աղիք, FMF և ԴՆԹ մեթիլացում:

Գրական տվյալների հիման վրա կատարված այս հետազոտությամբ հիմնավորվեց ՊՀ-ի ժամանակ տեր-միկրոբիոտա երկխոսության գնահատման համար աղիքային կոմենսալ *E. coli* բակտերիաների ԴՆԹ-ի մեթիլացման հետազոտությունների կարևորությունը:

Բանալի բառեր և բառակապակցություններ

FMF, պրոբիոտիկ, *E. Coli*, մեթիլացում, ԴՆԹ, աղիքային միկրոբիոտա:

ПРОБИОТИКИ И ПЕРИОДИЧЕСКАЯ БОЛЕЗНЬ: МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК КОММЕНСАЛЬНЫХ *Escherichia coli*

ВАРДАН ЦАТУРЯН

заведующий военно-медицинским факультетом, заведующий кафедрой военной терапии
Ереванского государственного медицинского университета
доктор медицинских наук
vtsaturian@mail.ru

ЭЛЯ ПЕПОЯН

научный сотрудник отдела безопасности пищевых продуктов и биотехнологии
Армянского национального аграрного университета
elyap@yandex.ru

МАРИНЕ БАЛАЯН

старший научный сотрудник отдела безопасности пищевых продуктов и биотехнологии
Армянского национального аграрного университета
кандидат биологических наук
marine.balayan@gmail.com

АСТГИК ПЕПОЯН

заведующая отделом
безопасности пищевых продуктов и биотехнологии Армянского национального
аграрного университета
доктор биологических наук, профессор
aperoyan@gmail.com

Аннотация

Соблюдение/установление специальных диет - один из основных пунктов в управлении многих заболеваний. Известно также, что использование определенных продуктов во время болезней может вызвать предсказуемые сдвиги в кишечных бактериальных сообществах. С другой стороны, пробиотики рекомендуются для восстановления неблагоприятных изменений микробиоты кишечника. Более того, пища, обогащенная специальными пробиотиками, может стать основой некоторых диет. Выбор пробиотиков, а также целенаправленная доставка пробиотиков через пищу требует серьезных научно-технических подходов для того, чтобы сохранять/стимулировать рост бактерии-пробиотика посредством синбиотического питания.

Периодическая болезнь (ПБ, PD, FMF, семейная средиземноморская лихорадка) - это аутосомно-рецессивное системное самовоспалительное заболевание, и характеризуется периодическими приступами лихорадки, серозита, синовитом и/или рецидивирующими дерматитами. Для управления ПБ может успешно использоваться диета с низким содержанием соли/жиров. Точная роль кишечных бактерий еще полностью не ясна, но в патогенезе ПБ широко обсуждается важность диалога хозяин-микробиота. Целью настоящего исследования было определение актуальности

исследований метилирования ДНК кишечных комменсальных *E. coli* ПБ пациентов для оценки диалога хозяин-микробиота. Для сбора данных из PubMed (1990-2021) были использованы следующие ключевые слова: *E. coli*, кишечник, FMF и метилирование ДНК.

Анализ литературных данных обосновал важность исследований метилирования ДНК кишечных комменсальных бактерий *E. coli* для оценки диалога хозяин-микробиота во время ПБ.

Ключевые слова и фразы

FMF; *E. coli*; пробиотик; метилирование; ДНК; IBD; кишечная микробиота.

Introduction

It is also known that the intake of particular food might provide predictable shifts in gut bacterial communities in diseases (Singh et al., 2017). On the other hand, probiotics are suggested to restore the unfavourable changes in gut microbiota (Sreeja et al., 2013). Moreover, food enriched with specific probiotics might be the basis of certain diets, but the selection of probiotics and its targeted delivery through food requires serious scientific-technological approaches to stimulate/keep the growth of probiotic through synbiotic nutrition (Terpou et al., 2019).

Although the precise role of gut bacteria in PD pathogenesis is not clear yet, the acceptance of the importance of host-microbiota dialogue in the diseased gut increase (Maynard et al., 2012; van Baarlen et al., 2013). The experiments have identified bacterial DNA and its unmethylated CpG motifs as another microbial stimulus, which can be sensed by cells of the innate immune system, inducing synthesis of an array of cytokines by immune cells (Peter, 2010; Pone et al., 2012).

It is commonly accepted now that gut microbiota maintains the human health-diseases balance (Lozupone et al., 2012) via its interaction with the immune system (Craig et al., 2012, Pepoyan et al., 2018; Galstyan et al., 2018) and can potentially be the target of a well-defined diet for the prevention of various diseases. Noninfectious somatic “nutrition”-relevant diseases like obesity, diabetes type II, metabolic (MD) and cardiovascular diseases (CVD) are also dependent on both the diet and gut microbiota (Tremaroli & Bäckhed, 2012). Candidate mechanisms initiating these pathologies are described (Manco et al., 2010). Moreover, microbiome (genomic), proteomic and metabolomic studies allowed more sophisticated analysis and sampling of these complex systems by culture-independent methods (Weinstock, 2012).

This study aims to clarify if the investigations on DNA methylation of gut commensal *E. coli* in FMF disease have actuality for evaluating host-microbiota dialogue.

Material and Methods

Following keywords: gut microbiota, *E. coli*, gut, FMF, probiotics and DNA methylation were used to collect data from PubMed (1990-2021).

Results

300 to 500 different species of commensal bacteria that colonize the gastrointestinal tract of mammals (Salzman et al., 2009; Kamada et al., 2013) play an important role in maintaining human health by preventing colonization by pathogens, degrading dietary and *in situ* produced compounds, producing nutrients, shaping and maintaining the normal mucosal and systemic immunity (Lee & Mazmanian, 2010; Clemente et al., 2012; Stecher et al., 2013). Other essential functions of commensal microbiota became apparent, including the influence on the lipid metabolism of the host (Wall R. et al., 2009) and therefore association with obesity (Ley et al., 2006; Turnbaugh et al., 2006, DiBaise et al., 2008) and more peripheral also with intestinal homeostasis, repair and angiogenesis (Sekiroy, 2010).

Quorum-sensing systems are widespread in the bacterial world, existing in both Gram-negative and Gram-positive bacteria (Henke & Bassler, 2004; Dubey & Ben-Yehuda, 2011). The populations of bacteria employ a range of signalling strategies to exchange information, like the secretion of quorum-sensing autoinducers and contact-dependent signalling mechanisms (Zeuthen et al., 2006). Certain bacteria carry out collective activities using different quorum-sensing molecules, such as tracking their cell numbers and synchronizing gene expression. Furthermore, Quorum sensing is used to regulate to limit bacterial pathogenesis such as virulence-factor secretion, biofilm formation, conjugation, and antibiotic production (Konga et al., 2006; Feng & Zhou, 2012).

The extensive research materials collected so far witness the relevance of the intestinal microbiota to the pathogenesis of IBD and FMF. It is now generally accepted that stimuli coming from the commensal microbiota influence the immune cells of the gut (Blango & Mulvey, 2009). In healthy individual bacteria-immune cell interactions leads to gut immune homeostasis accompanied by tolerance to the microbiota. The immune system of healthy individuals can discriminate appropriately between pathogens toward which an active immune response should be elicited and harmless bacteria that should be tolerated by the active down-regulation of the immune response. An immune system abnormality in response to normal bacteria has been linked to conditions like food allergies and Crohn's disease (CD) (Shanahan et al., 2004).

Nowadays, enteric microbiota is recognized as an attractive therapeutic target in treating IBD, as dysbiosis is a frequent condition in IBD patients. Interestingly, it has been shown that the bacterial flora of CD patients is different from the one of healthy individuals and also of ulcerative colitis patients (Elinav et al.; 2011; Hao et al.; 2013). The modulation of the gut microbiota with probiotic microbes and prebiotic factors seems to prove helpful in preventing and controlling human diseases (Gill & Guarner, 2004). Based on many clinical and experimental observations, it would be feasible to hold that the characteristics of the luminal milieu embedding the luminal prokaryotic cells influence the balance between luminal prokaryotic and the mucosal eukaryotic human cells and that consequent immunological and humoral local or systemic responses take part in the pathophysiology of Crohn's disease. Therefore, bacteriotherapy seems to play a relevant role in its treatment and prevention.

Furthermore, recent experiments have identified bacterial DNA, and unmethylated CpG motifs in particular, as another microbial stimulus that can be sensed by cells of the innate immune system and induce the synthesis of an array of cytokines by immune cells

(Hotamisligil, 2010; Pone et al., 2012). It is essential to point out that bacteria vary and hence differ in immunostimulatory DNA content.

The DNA of many bacterial (and eukaryotic) species contains 5-methylcytosine (5mC) in addition to cytosine. In *Escherichia coli*, some adenine and cytosine bases are modified to 6-methyladenine and 5-methylcytosine. These modified bases are products of reactions catalyzed by three enzymes that are specified by the host specificity (*hsd*), DNA adenine methylation (*dam*), and DNA cytosine methylation (*dcm*) genes. The methylation reaction occurs on double-stranded DNA in the presence of AdoMet.

Mechanisms of interactions of pathogenic bacteria with the host are well established, but very little is known about the interaction of commensal bacteria with the host. There are some indications only that gut commensals can downregulate the inflammatory responses. The importance of gut commensal *E. coli* was described in several studies (Mirzoyan et al. 2007; Stepanyan et al. 2007; Gasparyan et al. 2013; Pepoyan et al. 2015). The evaluation of the duration of the growth phases for the predominant gut commensal *E. coli* in familial Mediterranean fever (FMF) disease patients revealed that the duration of the preparatory growth phase for the *E. coli* "diseased" strains was shorter. In contrast, the duration of the logarithmic growth phase was longer ($P < 0.03$) than the appropriate growth parameters for the "healthy" isolates (Pepoyan et al., 2017). Moreover, the effects of probiotic strain Narine on the growth of commensal *E. coli* isolates in FMF patients were described (Pepoyan et al., 2017).

Thus, taking into account the above-mentioned information, it is possible to conclude that DNA methylation of gut commensal *E. coli* might be important in the clarification/evaluation of host-microbiota dialogue in FMF disease.

REFERENCES

1. Blango M.G, Mulvey M.A. Bacterial landlines: contact-dependent signalling in bacterial populations, *Curr Opin Microbiol.* 2009, 12(2):177-181.
2. Clemente J.C. et al. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell* 2012, 148 (6): 1258-1270.
3. Craig L.M., Charles O.E., Robin D.H., Weaver C.T. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature* 2012, 489: 231-241.
4. DiBaise J.K. et al. Gut microbiota and its possible relationship with obesity. *Mayo Clinic Proceedings.* Elsevier 2008, 83(4) :460-469.
5. Dubey G. P., Ben-Yehuda S. Intercellular nanotubes mediate bacterial communication. *Cell* 2011, 144(4) :590-600.
6. Ekinici R.M.K., Balci S., Bisgin A., Cetin F.T., Tumgor G. The contribution of diet preference to the disease course in children with familial Mediterranean fever: a cross-sectional study. *Reumatologia* 2020, 58(2):81-86.
7. Elinav E. et al. NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell* 2011, 145(5):745-757.
8. Feng F., Zhou J.M. Plant–bacterial pathogen interactions mediated by type III effectors. *Current opinion in plant biology* 2012, 15(4) :469-476.

9. Galstyan L., Tsaturyan V., Pepoyan A. Efficacy of pre-and probiotic therapy for the management of periodic disease and hypoxic-ischemic encephalopathy of newborns: NLRP3 inflammasome. PARMA (in Armenian), 2018, 57:49-51.
10. Gasparyan G., Balayan M., Grigoryan A. et al. Growth peculiarities of commensal *Escherichia coli* isolates from the gut microflora in Crohn's disease patients. Biophysics 2013, 58:537–542 <https://doi.org/10.1134/S0006350913040064>
11. Gill H.S., Guarner F., Postgrad. Probiotics and human health: a clinical perspective. Med. J. 2004, 80:516-526.
12. Hao L.Y., Liu X., Franchi L. Inflammasomes in inflammatory bowel disease pathogenesis. Current opinion in gastroenterology 2013, 29(4):363-369
13. Henke J.M., Bassler B.L. Bacterial social engagements. Trends in cell biology 2004, 14(11):648-656
14. Hotamisligil G.S. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. Cell 2010, 140(6):900-917.
15. Kamada N. et al. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. Nature Reviews Immunology 2013, 13(5):321-335.
16. Kong K.,-F., Vuong C., Otto M. Staphylococcus quorum sensing in biofilm formation and infection. International Journal of Medical Microbiology 2006, 296(2-3):133-139
17. Lee Y.K., Mazmanian S.K. Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? Science 2010, 330(6012):1768-1773
18. Ley R.E., Turnbaugh P.J., Klein S., Gordon J.I. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. Nature 2006, 444:1022-1023.
19. Lozupone C.A., Stombaugh J.I., Gordon G.I., Jansson J.K., Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota, Nature 2012, 489:220-230.
20. Manco M., Putignani L., Bottazzo G. Gut Microbiota, Lipopolysaccharides, and Innate Immunity in the Pathogenesis of Obesity and Cardiovascular Risk. Endocrine Reviews 2010, 31(6):817–844.
21. Mirzoyan N., Pepoyan A., Trchounian A. Modification of the biophysical characteristics of membranes incommensal *Escherichia coli* strains from breast cancer patients, FEMS Microbiology Letters 2006, 254(1):81–86 <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2005.00002.x>
22. Pepoyan A.Z., Balayan M.H., Manvelyan A.M., Mamikonyan V., Isajanyan M., Tsaturyan V.V., Kamiya S., Netrebov V., Chikindas M.L. Lactobacillus acidophilus INMIA 9602 Er-2 strain 317/402 probiotic regulates the growth of commensal *Escherichia coli* in the gut microbiota of familial Mediterranean fever disease subjects. Lett Appl Microbiol. 2017, 64(4):254-260. DOI: 10.1111/lam.12722. Epub 2017 Feb 27. PMID: 28140472
23. Pepoyan A. et al. Antibiotic resistance of *E. COLI* of the intestinal microbiota in patients with FMF. Klinicheskaia meditsina 2015, 93(7): 37-39
24. Pepoyan A., Balayan M., Manvelyan A., Galstyan L., Pepoyan S., Petrosyan S., Tsaturyan V., Kamiya S., Torok T., Chikindas M. Probiotic Lactobacillus Acidophilus Strain INMIA 9602 Er 317/402 administration Reduces the Numbers of Candida albicans and Abundance of Enterobacteria in the Gut Microbiota of Familial

- Mediterranean Fever Patients. *Frontiers in immunology* 2018, 9:1426
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01426>.
25. Pone E.J. et al. BCR-signaling synergizes with TLR-signaling for induction of AID and immunoglobulin class-switching through the non-canonical NF- κ B pathway. *Nature Communications* 2012, 3:767
 26. Salzman N.H. et al. Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. *Nature immunology* 2009, 11(1):76-82
 27. Sekirov I. et al. Gut microbiota in health and disease. *Physiological Reviews* 2010, 90(3):859-904
 28. Shanahan F. Host–flora interactions in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases* 2004, 10(7):16-24
 29. Singh R.K., Chang H.W., Yan D., et al. Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health, *J Transl Med* 2017, 15(1):73.
 30. Sreeja V., Prajapati J.B. Probiotic Formulations: Application and Status as Pharmaceuticals-A Review, *Probiotics Antimicrob Proteins* 2013, 5(2):81-91.
 31. Stecher B., Maier L., Hardt W.D. 'Blooming' in the gut: how dysbiosis might contribute to pathogen evolution, *Nature Reviews Microbiology* 2013, 11(4):277-284
 32. Stepanyan K., Balayan M., Vassilian A. et al. Some growth peculiarities and membrane characteristics of probiotic strains of *Escherichia coli*. *Biochem. Moscow* 2007, Suppl. 1: 331–335 <https://doi.org/10.1134/S1990747807040095>
 33. Terpou A., Papadaki A., Lappa I.K., Kachrimanidou V., Bosnea L.A., Kopsahelis N. Probiotics in Food Systems: Significance and Emerging Strategies Towards Improved Viability and Delivery of Enhanced Beneficial Value, *Nutrients* 2019, 11(7):1591.
 34. Tremaroli V., Bäckhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* 2012, 489:242-249.
 35. Turnbaugh P.J., Ley R.E, Mahowald M.A, Magrini V, Mardis E.R, Gordon J.I An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 2006, 444:1027-1031
 36. von Bodman S.B., Bauer W.D., Coplin D.L. Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. *Annual review of phytopathology* 2003, 41(1):455-482
 37. Wall R. et al. Metabolic activity of the enteric microbiota influences the fatty acid composition of murine and porcine liver and adipose tissues. *The American journal of clinical nutrition*. 2009, 89(5):1393-1401
 38. Weinstock G. M. Genomic approaches to studying the human microbiota. *Nature* 2012, 489:250-256.
 39. Zeuthen L.H., Christensen H.R., Frøkiær H. Lactic Acid Bacteria Inducing a Weak Interleukin-12 and Tumor Necrosis Factor Alpha Response in Human Dendritic Cells Inhibit Strongly Stimulating Lactic Acid Bacteria but Act Synergistically with Gram-Negative Bacteria. *Clin Vaccine Immunol.* 2006, 13(3): 365–375. DOI: 10.1128/CVI.13.3.365-375.2006

Հոդվածը ներկայացվել է տպագրության 23.03.2021 թ.,
 ուղարկվել է գրախոսության 31.03.2021 թ., ընդունվել է տպագրության 06.04.2021 թ.: