

## Kajian Bioinformatika terhadap *Transient Receptor Potential Vanilloid 1* (TRPV1) pada Risiko Osteoarthritis Sendi Lutut

Eko Poerwanto

Departemen Ilmu Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas YARSI

### Abstrak

Informasi lingkungan internal dan eksternal dapat mengaktifkan sistem saraf pusat melalui berbagai reseptor sensorik. Rasa nyeri memberi peringatan ada sesuatu yang salah, dan berkaitan dengan perasaan tidak menyenangkan. *Transient Receptor Potential Vanilloid 1* (TRPV1) berperan sebagai detektor dan regulator pengaturan suhu tubuh, serta penting dalam timbulnya sensasi nyeri. Osteoarthritis (OA) menimbulkan nyeri, merusak fungsi persendian, mengganggu kemampuan fisik dan menurunkan kualitas hidup. Tulisan ini adalah, kajian bioinformatika gen **TRPV1** *Homo sapiens* dan mutasinya yaitu **TRPV1 Ile585Val** dalam hubungan dengan risiko OA sendi lutut. Kajian bioinformatika gen TRPV1 dan mutasinya menggunakan database berbagai situs. Kajiannya meliputi analisis komposisi, struktur sekunder, analisis 3D, profil dan topologi protein TRPV1. Primer dirancang menggunakan *Pick Primer-Primer* BLAST dan PerlPrimer. Analisis situs restriksi gen TRPV1 memperlihatkan gen tersebut adalah *transient receptor potential cation channel, subfamily V, member NC\_000017.11* dengan panjang basa nukleotida 43966 bp, dan berlokasi pada kromosom 17p13.2 serta memiliki 17 ekson dan 16 intron. Protein TRPV1 NP\_542435.2 mempunyai 839 asam amino, berat molekul 95 kDa, merupakan protein transmembran, tempat ikatan ATP, kanal ion kalsium, tempat ikatan fosfoprotein, reseptor sinyal transmembran, termoreseptor dan nosiseptif reseptor. TRPV1 terbentuk atas komponen:  $\alpha$ -heliks;  $\beta$ -strand dan koil. Mutasi SNP rs8065080 Ile585Val adalah mutasi *missense*, merupakan substitusi kodon (ATC menjadi GTC) posisi 2028. Translasi Ile585Val pada posisi asam amino 585 mengubah IsoLeusin menjadi Valin, yang berdekatan dengan situs aktif CK2 dan terlibat dalam proses fosforilasi berbagai sinyal, misalnya proses diferensiasi sel, proliferasi, apoptosis, irama sirkadian, transport membran dan proses *signaling* nyeri neuropatik. Mutasi TRPV1 Ile585Val berhubungan dengan patofisiologi molekular nyeri akibat OA sendi lutut.

**Kata kunci:** osteoarthritis, sendi lutut, bioinformatika, gen TRPV1

## Bioinformatics Studi of the *Transient Receptor Potential Vanilloid 1* (TRPV1) in the Risk of Osteoarthritis of the Knee Joints

### Abstract

Internal and external informations can activate central nervous system via sensorial receptors. Pain warns our body that something is wrong, and is associated with unpleasant feelings. Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) acts as a detector and regulator of body temperature, as well as pain sensation. Osteoarthritis (OA) causes pain, impairs joint function and physical ability, and thus, ultimately decreases quality of life. In this paper the bioinformatics of *Homo sapiens* TRPV1 gene and its mutation (i.e. TRPV1 Ile585Val) in association with the risk of knee OA joints will be discussed. The bioinformatics studi was conducted based on the database available on various websites. The studies include composition analysis, secondary structure, 3D analysis, protein profile and TRPV1 topology. Primers used for these studies were designed using Pick Primer-Primer BLAST dan PerlPrimer software. The results restriction sites analysis showed that the gene was a transient receptor potential cation channel, a subfamily V, a member of NC\_000017.11 with a nucleotide base length of 43966 bp, and is located on chromosome 17p13.2 with 17 exons and 16 introns. The TRPV1 protein NP\_542435.2 has 839 amino acids and a molecular weight of 95 kDa. It is a transmembrane protein-ATP binding; calcium ion channel; phosphoprotein bond; transmembrane signal receptor, thermoceptor and nociceptive receptor; consistng of  $\alpha$ -heliks,  $\beta$ -strand and coil. The SNP mutation of rs8065080 Ile585Val is a missense mutation, which replaced codon ATC to GTC at position

2028. The translation of Ile585Val at the amino acid position 585 converts IsoLeusin to Valin, which is adjacent to the active site of CK2 and is involved in the phosphorylation of various signals such as cell differentiation, proliferation, apoptosis, circadian rhythm, membrane transport and neuropathic pain signaling processes. Mutation of TRPV1 Ile585Val is associated with the pathophysiology of molecular pain due to knee OA joints.

**Keywords:** osteoarthritis, knee joint, bioinformatics, TRPV1 gene

Koresponden; Email: [poer\\_1st@yahoo.com](mailto:poer_1st@yahoo.com)

## Pendahuluan

Informasi terhadap lingkungan internal dan lingkungan eksternal dapat mengaktifkan sistem saraf pusat melalui berbagai reseptor sensorik. Reseptor-reseptor tersebut bersifat transduser yang mengubah berbagai bentuk energi di lingkungan menjadi aksi potensial di dalam neuron. Reseptor sensorik dikhususkan untuk merespons bentuk energi tertentu namun karena banyaknya variasi energi maka terdapat banyak reseptor yang berbeda.<sup>1</sup>

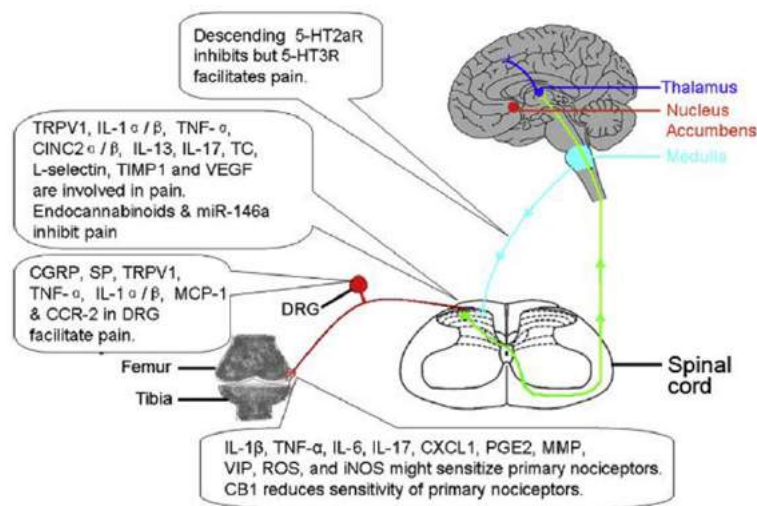
Nyeri berbeda dengan sensasi lain, nyeri memberi peringatan bahwa ada sesuatu yang salah. Nyeri mendahului sinyal lain dan berkaitan dengan perasaan tidak menyenangkan. Nyeri merupakan aspek pelengkap fisik dari refleksi protektif mutlak. Rangsangan nyeri umumnya memicu respons menarik diri atau menghindar yang kuat. Rangsang nyeri akan menimbulkan sensasi yang jelas, tajam dan terlokasi yang kemudian diikuti oleh sensasi yang tumpul, difus, kuat, dan tidak menyenangkan. Kedua jenis sensasi tersebut disebut sebagai nyeri cepat dan lambat. Rangsangan yang makin jauh dari otak menimbulkan perbedaan waktu yang semakin besar diantara kedua komponen nyeri tersebut. Nyeri cepat disebabkan oleh aktivitas di serabut nyeri A $\delta$ , sedangkan nyeri lambat disebabkan oleh aktivitas di serabut C.<sup>1</sup>

*Transient receptor potential cation channel subfamily V member 1*(TRPV1) dikenal sebagai protein reseptor capsaicin (senyawa dalam cabai yang menyebabkan rasa panas) dan senyawa vaniloid, yang disandi oleh gen TRPV1. Gen TRPV1

merupakan gen pertama dalam kelompoknya yang berhasil disolasi dan merupakan bagian kelompok protein transient receptor potensial (TRP).<sup>2-4</sup> Protein tersebut juga merupakan anggota kelompok TRPV sebagai kanal ion. Fungsi utama TRPV1 adalah sebagai detektor dan regulator dalam pengaturan suhu tubuh, serta penting dalam timbulnya sensasi rasa panas dan nyeri.<sup>5</sup>

Molekul protein TRPV1 berbentuk kanonik terdiri atas 839 asam amino dengan berat molekul ~ 95 kDa dan terdiri atas 6 domain transmembran dan mencakup area pembentuk pori yang terletak antara domain transmembran 5 dan 6. Ujung N-terminal dan C-terminal berada di sisi sitoplasma. Tiga N ankyrin terminal (ANK) berulang terdapat di ujung N-terminal.<sup>6</sup> TRPV1 adalah saluran kation nonselektif yang dapat diaktifkan dengan berbagai macam rangsangan fisik dan kimia eksogen dan endogen. Aktivator paling utama pada TRPV1 adalah: suhu lebih tinggi dari 43°C (109°F); kondisi asam; capsaicin; alil isotiosianat (senyawa tajam di mustard dan wasabi).<sup>7</sup> Aktivasi TRPV1 mengarah ke rasa menyakitkan dan sensasi terbakar. Aktivator endogen meliputi: pH rendah (kondisi asam), anandamide endocannabinoid, N-oleil-dopamin dan N-arachidonoyl-dopamin. Reseptor TRPV1 ditemukan terutama di neuron nosiseptif sistem saraf perifer, tetapi juga terdapat dalam banyak jaringan, termasuk sistem saraf pusat. TRPV1 terlibat dalam transmisi dan modulasi nyeri (nosisepsi), serta integrasi stimulus beragam yang menyakitkan.<sup>8-9</sup>

Osteoarthritis (OA) adalah penyakit penting yang mengganggu kemampuan fisik



**Gambar 1.** Ilustrasi mekanisme nyeri akibat OA. Terdapat beberapa senyawa bioaktif diperifer, spinal dan supraspinal. Diantaranya adalah *TRPV1* (Zang *et al.*, 2013)<sup>15</sup>

yang juga menjadi masalah nasional karena berdampak pada menurunnya kualitas hidup akibat rasa nyeri dan hilangnya fungsi persendian.<sup>10</sup> Nyeri adalah gejala utama yang dirasakan pada kasus OA. Nyeri dan hilangnya fungsi persendian yang didukung oleh pemeriksaan radiografik menjadi indikasi untuk dilakukannya penggantian sendi melalui tindakan arthroplasty.<sup>11</sup> Satu hal penting yang diduga sangat mempengaruhi tingkat keparahan pada OA dihubungkan dengan tingkat sensitivitas rasa nyeri secara individual adalah berhubungan dengan faktor genetik.<sup>12</sup> Hal itu berhubungan dengan aktivitas *transient receptor potential cation channel*, subfamily V, member 1 (*TRPV1*) yang berperan dalam reaksi hipersensitivitas terhadap rasa nyeri akibat terjadinya kerusakan jaringan.<sup>13</sup> Pada studi preklinik dengan menggunakan hewan coba dibuktikan peran *TRPV1* pada kejadian OA.<sup>14-15</sup> Pada kasus lain dibuktikan bahwa pemberian antagonis *TRPV1* mampu memblokir sensasi hiperalgesia dan allodynia yang terjadi. Pada kasus OA, *TRPV1* diekspresikan tidak hanya di sel saraf saja, namun terdapat pula pada sel sel dalam persendian meliputi kondrosit, osteoklast,

osteoblast dan fibroblast synovial.<sup>16-18</sup>

Varian asam amino, pada gen *TRPV1* yang disandi pada posisi asam amino Ile585Val berdasarkan data *single nucleotide polymorphism* (SNP) rs8065080 berhubungan dengan sensitivitas nyeri thermal.<sup>19-20</sup> Diduga hal tersebut ikut menjadi faktor yang menentukan tingkat keparahan pada OA sendi lutut yang ditandai oleh kerapuhan tulang rawan sendi yang memperparah rusaknya sendi.<sup>21</sup> Suatu kondisi genetik dalam sensitivitas rasa nyeri dan proses kerusakan sendi akibat arthritis yang terjadi pada sendi lutut menjadi perhatian penting dengan keberadaan *TRPV1* sebagai gen pro-nosiseptif yang berperan dalam proses patologis pada tulang rawan yang tanda-tandanya dapat ditemukan melalui pemeriksaan radiografi. Terdapat perbedaan tingkat risiko akibat OA pada sendi lutut, dan perbedaan tersebut berhubungan dengan variabel usia, *gender*, *BMI* dan tingkat kerusakan radiologis.<sup>21</sup> Diduga terdapat perbedaan varian genetik SNPs pada *TRPV1* jika dihubungkan dengan kelompok etnis Eropa dan Asia maupun dengan etnis yang lainnya. Didasari temuan klinis nyeri, maka dapat disimpulkan bahwa terdapat kontribusi

faktor genetik dalam tingkat morbiditas OA yang berkisar antara 40% - 60% kasus OA yang meliputi tempat lesi pada sendi lutut, sendi panggul dan pergelangan tangan.<sup>22</sup>

TRPV1 berperan penting dalam proses nyeri, dalam hal ini nyeri akibat OA. Ekspresi TRPV1 meningkat pada serabut sel saraf primer yang mempersarafi sendi pada kasus OA. Variasi genetik pada TRPV1 berhubungan dengan kerusakan struktural pada sendi akibat OA, yang mengindikasikan bahwa TRPV1 diekspresikan di dalam sendi dan pada jalur rasa nyeri.<sup>14</sup> Tujuan utama dari penulisan ini adalah untuk menelusuri dan mengkaji secara bioinformatika gen *TRPV1 Homo sapiens* dan mutasinya yaitu *TRPV1 Ile585Val* dalam hubungannya dengan risiko terjadinya OA pada sendi lutut.

## Bahan dan Cara

### Bahan

Analisis untuk mendapatkan informasi awal tentang protein TRPV1 diperoleh dari situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Dimulai dari pencarian *reference sequence* genom [transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1 (**TRPV1**) (*Homo sapiens*)] dengan *accession number* **NC\_000017.11**(DNA); dan **gen ID: 7442**. Selanjutnya analisis diteruskan melalui *accession number* nucleotide **NM\_080704.3** untuk mRNA TRPV1, yang dilanjutkan dengan pencarian protein TRPV1, dengan *accession number* **NP\_542435.2**.

### Cara

Analisis bioinformatika pada gen TRPV1 dilakukan dengan menggunakan beberapa program *open source* dari *website* sebagai berikut:

1. Analisis struktur dan fungsi dari gen dan protein TRPV1 menggunakan pangkalan data bioinformatika dari situs [\[ncbi.nlm.nih.gov\]\(http://www.ncbi.nlm.nih.gov\) menu \*\*Gene\*\*, \*\*Nucleotide\*\* dan \*\*Protein\*\*; <http://www.uniprot.org> dan <http://www.ensembl.org>.](http://www.</a></li></ol></div><div data-bbox=)

2. Analisis mutasi **TRPV1 Ile585Val** pada **SNP rs8065080** mengacu pada referensi Valdes *et al.*,<sup>21</sup> menggunakan situs <http://www.uniprot.org> dan situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> menu **SNP**.
3. Analisis komposisi, profil dan topologi protein TRPV1 dan TRPV1 Ile585Val menggunakan situs dan program <http://www.expasy.org>; <http://cbs.dtu.dk> **TargetP**, **SignalP** & **TMHMM**; <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/> dalam menu **PSIPRED** versi 3.3; **MEMSAT3** & **MEMSAT-SVM**.
4. Analisis struktur sekunder melalui situs <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk> menu **PSIPRED**. Analisis 3D protein TRPV1 dan komparatif dengan TRPV1 Ile585Val menggunakan situs <http://www.expasy.org> menu **SwissModel**; <http://www.pdb.org> dan software **PYMOL**.
5. Disain primer untuk mengidentifikasi mutasi menggunakan situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> menu **Pick Primer** dan **Primer BLAST** dilanjutkan dengan software **PerlPrimer**. Analisis situs restriksi pada gen TRPV1 dilakukan dengan menggunakan software **NEBcutter** dari situs **REBASE**.

## Hasil dan Diskusi

### Analisis TRPV1: Struktur Gen, Transkripsi mRNA dan Protein

Informasi tentang gen *TRPV1* ditelusuri melalui situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> menu *gene* menggunakan *reference sequence* (RefSeq, Jul-2008) dengan *accession number* **NC\_000017.11** (DNA) dengan **gen ID: 7442**. Gen *transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1 (TRPV1)* dengan nama lain *vanilloid receptor subtype 1 (VR1)*. Merupakan protein eukarot pada Homo Sapiens, memiliki struktur dengan panjang basa nukleotida 43.966 bp, berbentuk DNA linear, tersusun secara komplemen (mulai 3.565.446 sampai dengan 3.609.411). Lokasi pada kromosom

17p13.2 untuk *Homo sapiens* (**Gambar 2a & 2b**); pada kromosom 10q24 untuk *Rattus norvegicus*. Panjang basa nukleotida gen TRPV1 sekitar 31.6 kbp dan terletak 3.51 kbp dari arah hilir lengan pendek.<sup>6</sup>

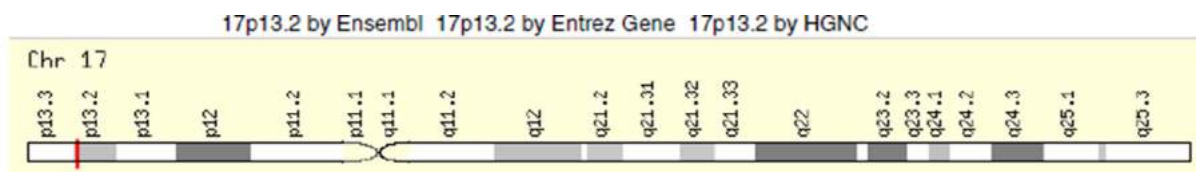
Hasil pencarian mRNA TRPV1 melalui situs <http://www.ncbi.nlm.gov> menu nucleotida menggunakan reference sequence (Refseq, Mar-2015) dengan *accession number* NM\_080704.3, TRPV1 mempunyai panjang sekuen 4191 bp berbentuk mRNA

linear. Hasil transkripsi menunjukkan gen *TRPV1* memiliki 17 ekson dan 16 intron. Transkrip mRNA dimulai pada ekson III, ekson I dan II tidak ditranslasikan. Empat varian transkrip menyandi protein yang sama, tetapi berbeda urutan 5 'UTR tiga alternatif *non coding* ekson 1, situs sambungan mengapit ekson-intron 7 menyimpang dari urutan yang umum, dan hal itu mungkin membantu menjelaskan hubungan varian yang melewati ekson 7. (**Gambar 3**)

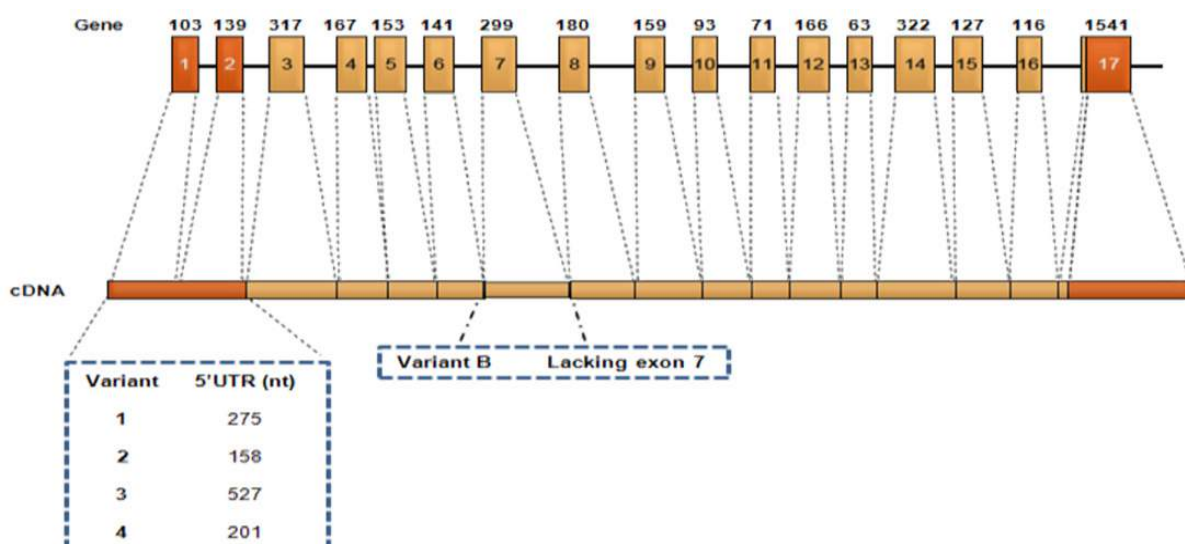
Chromosome 17 - NC\_000017.11



**Gambar 2a.** Lokasi gen TRPV1 Homo sapiens pada kromosom 17.



**Gambar 2b.** Lokasi gen TRPV1 Homo sapiens pada kromosom 17. (17p13.2).

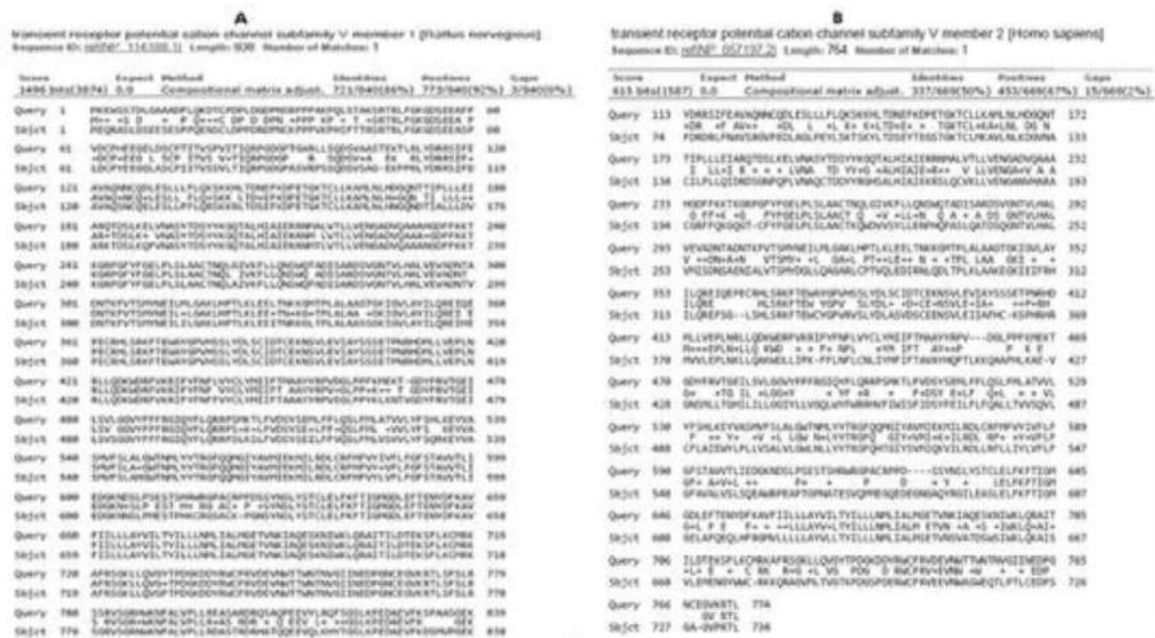


**Gambar 3.** TRPV1 terdiri dari 17 ekson & 16 intron. Transkripsi dimulai dari ekson 3. Dimodifikasi dari (Nabissi dan Santoni).<sup>6</sup>

Protein TRPV1 yang diakses dari situs <http://www.ncbi.nlm.gov> menu protein dengan *accession number* NP\_542435.2 (berdasar *refseq* NM\_080704.3) mempunyai urutan asam amino sebanyak 839, berbentuk linear dengan berat molekul (BM) 95kDa. Melalui situs <http://www.ncbi.nlm.gov> menu BLAST-protein BLAST dapat ditelusuri kemiripan (*homologi*) sekuen protein TRPV1 Homo Sapiens ini dengan spesies lain (*orthologi*) atau dengan sekuen lain (*paralogi*) pada spesies yang sama. Hal tersebut berdasarkan nilai identifikasi (*query coverage*) 100 %, nilai  $E \leq 0.0$ , sumber

referensi sekuen (*refseq*) yang serupa (NP) dan paling dekat nilainya yang diambil *accession number* sebagai orthologi adalah NP\_114188.1 (*transient receptor potential cation channel subfamily V member 1*;

TRPV1 [*Rattus norvegicus*]) score 1496; query coverage 100%,  $E$ -value  $\leq 0.0$  dan kemiripan 86%. Sebagai Paraloginya adalah NP\_057197.2 (*transient receptor potential cation channel subfamily V member 2*; TRPV2 [*Homo sapiens*]) dengan score 615; query coverage 78%;  $E$ -Value  $\leq 0.0$ ; kemiripan 50%. (Gambar 4).



**Gambar 4. Homologi protein TRPV1 Homo sapiens: (A). Orthologi TRPV1 pada protein TRPV1 Rattus norvegicus dengan kemiripan sekuens 86%. (B). Paralogi protein TRPV1 Homo sapiens pada protein TRPV2 Homo sapiens yang memiliki kemiripan sekuens 50%.**

Perbandingan fungsi dan atribut protein TRPV1 Homo sapiens, orthologinya pada TRPV1 Rattus norvegicus dan paraloginya pada TRPV2 Homo sapiens dapat ditelusuri melalui situs <http://www.uniprot.org> dengan menu UniprotKB. Hasil penelusuran didapatkan protein TRPV1 Homo sapiens dengan kode (Q8NER1), protein TRPV1 Rattus norvegicus dengan kode(O35433), dan protein TRPV2

Homo sapiens dengan kode (Q9Y5S1), memiliki fungsi yang mirip yaitu sebagai: tempat ikatan ATP, kanal ion kalsium, tempat ikatan fosfoprotein, reseptor signal transmembran, termoreseptor dan nosiseptif reseptor. Ketiga protein tersebut terletak pada Cell junction, sinaps, postsynaptic cell membrane dan multi-pass membrane protein. Secara umum TRPV1 merupakan protein transmembran.

Primary Assembly Mapping						
Assembly	SNP to Chr	Chr	Chr position	Contig	Contig position	Allele
GRCh38.p2	Fwd	17	3577153	<a href="#">NT_010718.17</a>	<a href="#">3088166</a>	T

RefSeqGene Mapping				
RefSeqGene	Gene (ID)	SNP to RefSeqGene	Position	Allele
<a href="#">NG_029716.1</a>	<a href="#">TRPV1 (7447)</a>	Rev	<a href="#">37259</a>	A

Gene Model(s)							
Function	mRNA				Protein		
	SNP to mRNA	Accession	Position	Allele change	Accession	Position	Residue change
missense	Rev	<a href="#">NM_080705.3</a>	2280	ATC → GTC	<a href="#">NP_542437.2</a>	585	I [Ile] → V [Val]
missense	Rev	<a href="#">NM_080705.3</a>	1954	ATC → GTC	<a href="#">NP_542436.2</a>	585	I [Ile] → V [Val]
missense	Rev	<a href="#">NM_080704.3</a>	2028	ATC → GTC	<a href="#">NP_542436.2</a>	585	I [Ile] → V [Val]
missense	Rev	<a href="#">NM_018277.5</a>	1911	ATC → GTC	<a href="#">NP_061197.4</a>	585	I [Ile] → V [Val]

Gambar 5. Data SNP menunjukkan mutasi gen TRPV1 pada posisi 2280, 1954, **2028** & 1911

## Ekspresi dan Fungsi TRPV1 pada Patofisiologi Nyeri

Pemahaman bioinformatika pada fungsi dan kondisi klinis protein TRPV1 diperoleh melalui situs <http://www.ncbi.nlm.gov> menu OMIM, PubMed atau dari situs <http://www.uniprot.org> menu **UniProtKB**. TRPV1 merupakan anggota kanal ion transient receptor potential (TRP) yang diaktivasi oleh temperatur dan berperan penting dalam kondisi nyeri akut, kronik dan inflamasi. Kanal ion TRP sangat sensitif juga terhadap senyawa kimia endogen yang bersifat inflamator.<sup>23</sup> Reseptor transient anggota potensial saluran kation subfamili V member 1 (TRPV1) atau vanilloid reseptor 1 adalah saluran kation non-selektif yang terlibat dalam deteksi dan transduksi rangsangan nosiseptif. Peradangan dan kerusakan saraf menghasilkan up-regulasi transkripsi TRPV1, karena itu modulator saluran TRPV1 berpotensi dan berguna dalam upaya pengobatan peradangan dan nyeri neuropatik.<sup>24</sup> Dalam mekanisme rasa nyeri, hal paling utama adalah proses sensitisasi pada *dorsal root ganglion* (DRG) di saraf perifer dan sistem sentral di medulla spinalis. Faktor neurotropik, protein kinase dan kanal ion memberikan kontribusi pula dalam proses sensasi nyeri. TRPV1 merupakan reseptor nosiseptif utama yang ada di neuron DRG, juga berperan sebagai integrator molekuler

dalam proses sensasi nyeri.<sup>25</sup> Pada tingkat protein, TRPV1 diekspresikan pada *dorsal root ganglia*, kulit, folikel rambut, kelenjar keringat, dan ginjal.<sup>26-27</sup>

### Varian Genetik TRPV1: *TRPV1Ile585Val*

Untuk mengetahui variasi genetik alami dan peran gen TRPV1 dapat ditelusuri melalui situs <http://www.ncbi.nlm.gov> menu SNP atau PubMed. Hasil penelusuran menunjukkan gen TRPV1 mempunyai variasi berdasar reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs8065080; Ile585Val merupakan mutasi missense yang terjadi pada kromosom 17 posisi 3577153 ; NG\_029716.1 pada posisi 37259; NM\_080704.3: c.1753 A > G dengan variasi alel berupa substitusi kodon (ATC) menjadi (GTC); NM\_080704.3 posisi 2028. Perubahan tersebut menghasilkan urutan protein yang mengubah asam amino pada posisi 585 (NP\_542435.2) dari **Isoleusin** menjadi **Valin** (Ile585Val) (Gambar 5). Dari referensi dijelaskan bahwa mutasi berdasar SNP rs8065080 Ile585Val berkorelasi dengan penyakit OA pada sendi lutut.<sup>28</sup> Mutasi yang terjadi adalah kategori **missense** yang mengubah asam amino penyusun protein namun tidak memberikan dampak pada sifat protein. Hal itu juga tidak mempengaruhi fungsi protein tersebut. Kemungkinan mutasi tidak terjadi pada posisi aktifnya, sehingga perubahan susunan asam amino

ini tidak merubah fungsi protein tersebut. Terdapat perbedaan tingkat risiko akibat osteoarthritis pada sendi lutut, dan perbedaan ini berhubungan dengan variabel usia, gender, BMI dan tingkat keparahan pada hasil radiologis. Diduga terdapat perbedaan varian genetik SNPs pada TRPV1 jika dihubungkan dengan kelompok etnis Eropa dan Asia maupun dengan etnis yang lainnya.<sup>21</sup>

**Analisis Protein TRPV1: Komposisi, Profil dan Lokasi**

Untuk mengetahui komposisi protein TRPV1 digunakan situs <http://www.expasy.org>

[org](http://www.expasy.org) menu ProtParam. Hasil penelusuran ProtParam diketahui ada beberapa perbedaan komposisi TRPV1 normal dengan mutan TRPV1 Ile585Val, antara lain berat molekul, komposisi atom, formula, jumlah atom, indeks instabilitas, indeks alifatik dan GRAVY (**Tabel 1**). Hasil penelusuran lebih lanjut ke situs <http://www.expasy.org> menu Protscale, profil skala asam amino menelusuri tendensi transmembran, nilai hidrofobik, glikosilasi dan prediksi membran heliks dari masing-masing molekul yang menyusun protein normal TRPV1 dan mutan TRPV1 Ile585Val mempunyai nilai yang relatif sama.

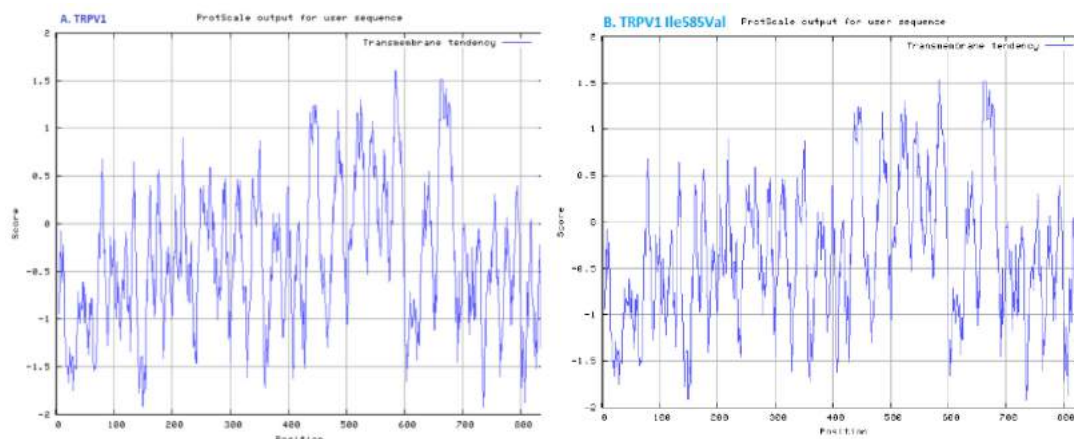
**Tabel 1. Analisis Fisiko-Kimia Protein TRPV1 & TRPV1 Ile585Val**

PARAMETER	PROTEIN TRPV1	PROTEIN TRPV1 Ile585Val
<b>JUMLAH ASAM AMINO</b>	839	839
<b>BERAT MOLEKUL</b>	94.956.3kDa	94.942.2kDa
<b>NILAI pI</b>	6.90	6.90
	Ala (A) 56 6.7%	Ala (A) 56 6.7%
	Arg (R) 44 5.2%	Arg (R) 44 5.2%
	Asn (N) 33 3.9%	Asn (N) 33 3.9%
	Asp (D) 46 5.5%	Asp (D) 46 5.5%
	Cys (C) 16 1.9%	Cys (C) 16 1.9%
	Gln (Q) 28 3.3%	Gln (Q) 28 3.3%
	Glu (E) 49 5.8%	Glu (E) 49 5.8%
	Gly (G) 48 5.7%	Gly (G) 48 5.7%
	His (H) 13 1.5%	His (H) 13 1.5%
	Ile (I) 38 4.5%	Ile (I) 37 4.4%
<b>KOMPOSISI ASAM AMINO</b>	Leu (L) 102 12.2%	Leu (L) 102 12.2%
	Lys (K) 50 6.0%	Lys (K) 50 6.0%
	Met (M) 23 2.7%	Met (M) 23 2.7%
	Phe (F) 47 5.6%	Phe (F) 47 5.6%
	Pro (P) 38 4.5%	Pro (P) 38 4.5%
	Ser (S) 61 7.3%	Ser (S) 61 7.3%
	Thr (T) 55 6.6%	Thr (T) 55 6.6%
	Trp (W) 11 1.3%	Trp (W) 11 1.3%
	Tyr (Y) 33 3.9%	Tyr (Y) 33 3.9%
	Val (V) 48 5.7%	Val (V) 49 5.8%
	Pyl (O) 0 0.0%	Pyl (O) 0 0.0%
	Sec (U) 0 0.0%	Sec (U) 0 0.0%
	Carbon C 4284	Carbon C 4283
<b>KOMPOSISI ATOM</b>	Hydrogen H 6685	Hydrogen H 6683
	Nitrogen N 1119	Nitrogen N 1119
	Oxygen O 1240	Oxygen O 1240
	Sulfur S 39	Sulfur S 39

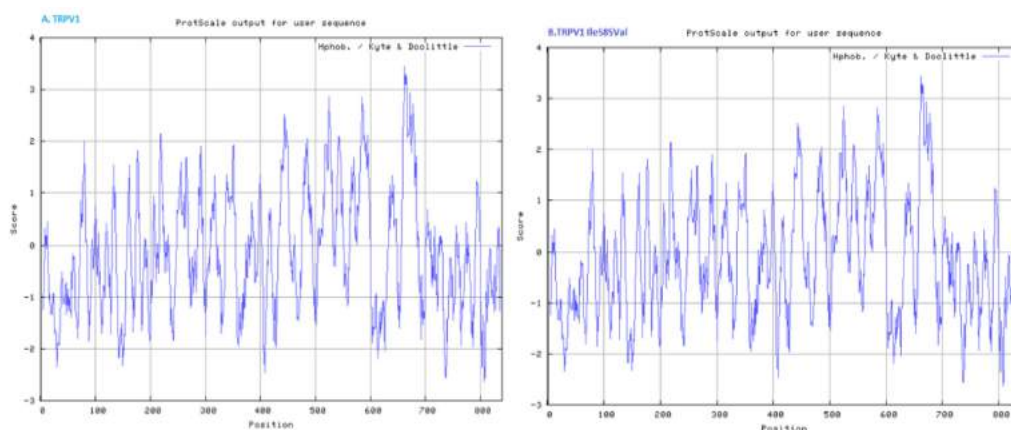


**Tabel 1. Analisis Fisiko-Kimia Protein TRPV1 & TRPV1 Ile585Val (Lanjutan)**

FORMULA	$C_{4284}H_{6685}N_{1119}O_{1240}S_{39}$	$C_{4283}H_{6683}N_{1119}O_{1240}S_{39}$
JUMLAH ATOM	13367	13364
ESTIMASI WAKTU PARUH	30 hours pd Mamalia	30 hours pd Mamalia
INDEKS INSTABILITAS	42.88	42.98
INDEKS ALIPHATIC	88.34	88.22
GRAND AVERAGE OF HYDROPATHICITY (GRAVY)	-0.148	-0.149



**Gambar 6.** Topologi protein TRPV1 normal (A) dan TRPV1 Ile585Val (B) berdasar analisis posisi pada transmembrane menggunakan skala Transmembrane tendency



**Gambar 7.** Topologi protein TRPV1 normal (A) dan TRPV1Ile585Val (B) berdasarkan sifat hidrofobik menggunakan skala HpHob./Kyte & Doolittle.

Analisis prediksi posisi protein TRPV1 dan TRPV1 Ile585Val pada transmembran menggunakan skala asam amino *Transmembrane tendency*. Hasilnya menunjukkan angka di atas 0.5 (bermakna di atas garis *cut off*), hal ini menunjukkan adanya kecenderungan bahwa kedua protein tersebut

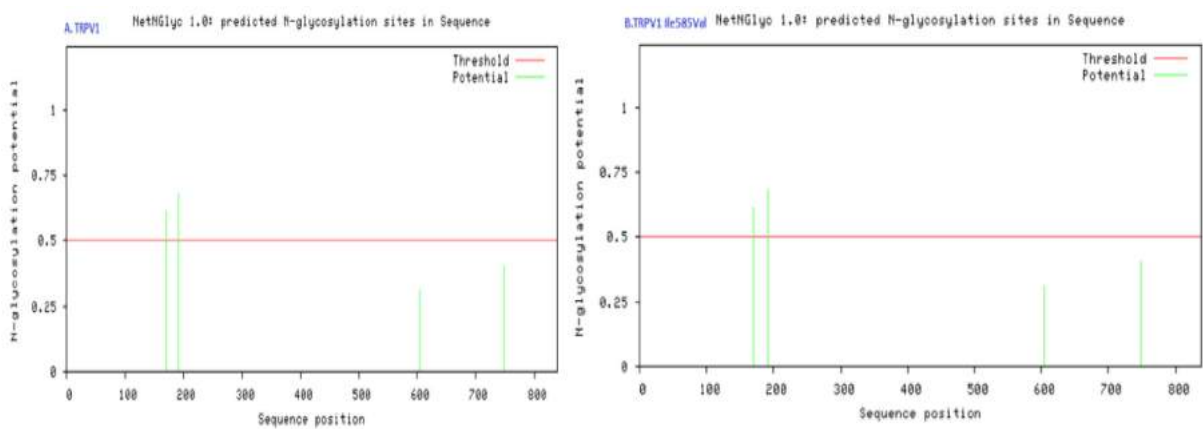
merupakan protein transmembran.(**Gambar 6**).

Analisis prediksi terhadap hidrofobisitas antara protein TRPV1 dan TRPV1 Ile585Val menggunakan *skala HpHob./Kyte & Doolittle*. Menunjukkan tidak adanya perbedaan sifat hidrofobik diantara kedua protein tersebut.(**Gambar 7**).

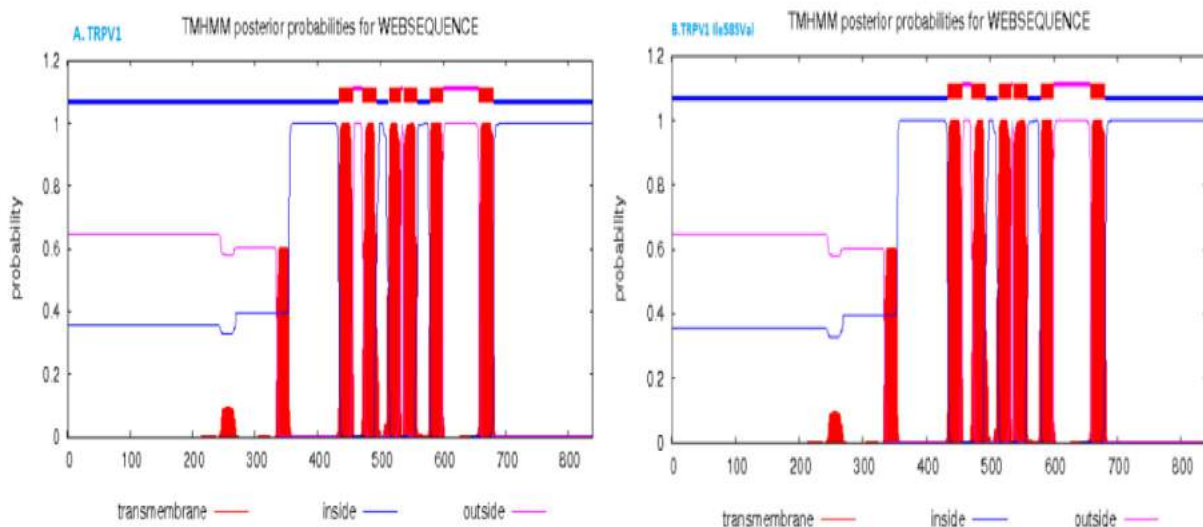
Analisis untuk proses glikosilasi pada protein TRPV1 dan TRPV1 Ile585Val menggunakan software NetNGlyc. Hasil analisis menunjukkan bahwa protein TRPV1 normal dan TRPV1 mutan memiliki kesamaan pola. Maknanya adalah motif glikosilasi tidak merubah struktur dan fungsi penting pada protein TRPV1 yang mengalami mutasi. Glikosilasi adalah suatu proses penting pada modifikasi pasca translasi yang mempengaruhi proses pelipatan, lokalisasi,

kelarutan, antigenisitas, aktivitas biologis dan interaksi protein dengan sel. (**Gambar 8**).

Prediksi membran heliks untuk protein TRPV1 dan TRPV1 Ile585Val pada membran, menggunakan program *predicting transmembrane protein topology with a Hidden Markov Model* (TMHMM). Hasil analisis menunjukkan tidak adanya perbedaan posisi helical transmembrane diantara kedua protein tersebut. (**Gambar 9**).



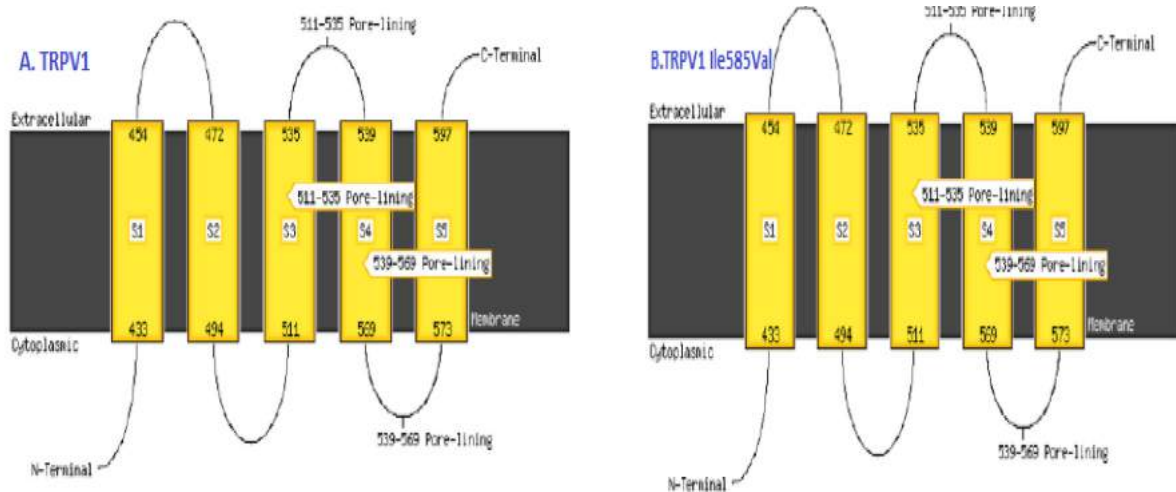
**Gambar 8.** Motif glikosilasi protein TRPV1 normal (A) dan TRPV1 Ile585Val mutan (B).



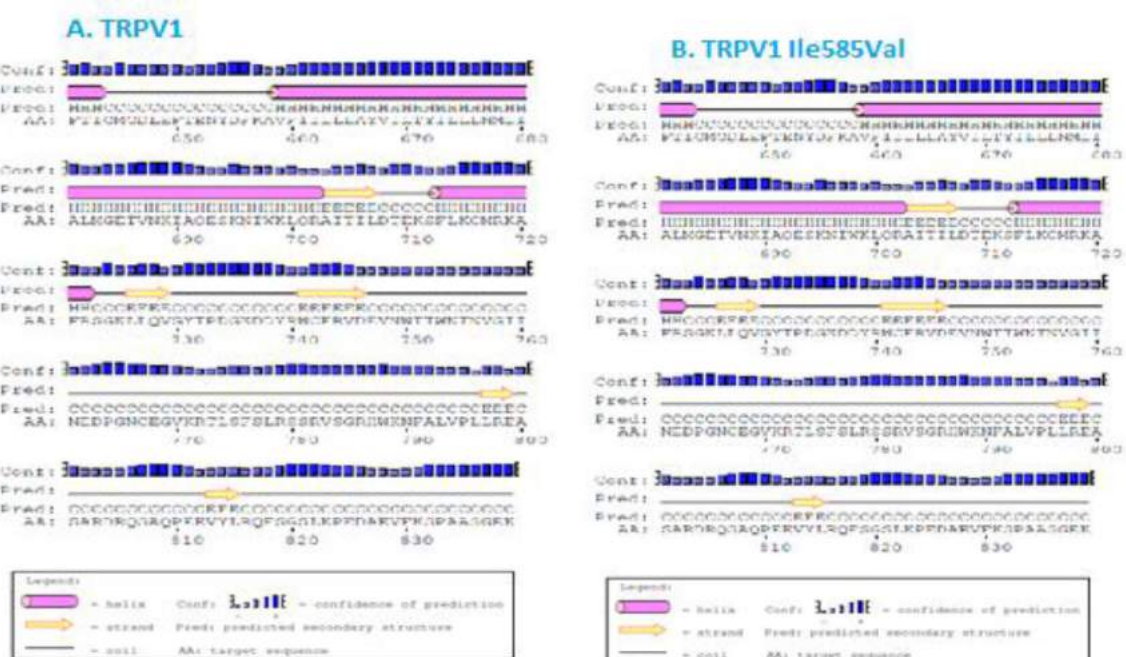
**Gambar 9.** Prediksi membran heliks menggunakan software TMHMM untuk protein TRPV1 normal (A) dan TRPV1 Ile585Val mutan (B).

Topologi protein melalui penelusuran menggunakan situs <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk> menu MEMSAT3 dan MEMSAT-SVM menunjukkan bahwa protein TRPV1 dan TRPV1 Ile585Val sama-sama merupakan protein transmembran yang terdiri dari 5 domain. Dengan ujung N-terminal berada pada cytoplasma dan C-terminal berada pada

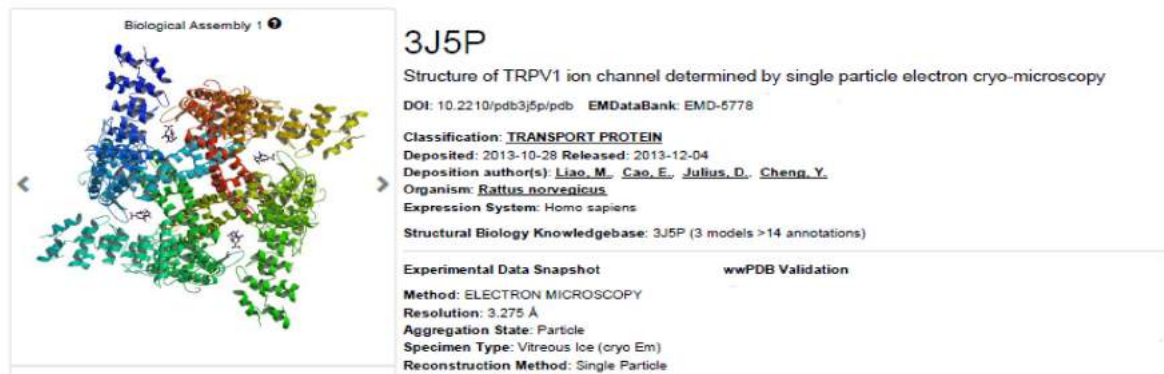
extra membran. Jalur pori berada diantara domain transmembran 4 dan 5 (Gambar 10). Data ini berbeda dengan data dari,<sup>6</sup> yang memperlihatkan bahwa Protein TRPV1 terdiri atas 6 domain transmembran dengan ujung N-terminal dan ujung C-terminal berada dalam sitoplasma dan posisi garis pori berada diantara domain transmembran 5 dan 6.



**Gambar 10.** Berdasar analisis MEMSAT3 & MEMSAT-SVM: Protein TRPV1 normal (A) dan protein TRPV1 Ile585Val mutan (B) merupakan protein transmembran dengan 5 domain dengan ujung N-terminal berada pada *cytoplasma* dan C-terminal berada pada membran luar.



**Gambar 11.** Struktur sekunder protein TRPV1 normal (A) dan TRPV1 Ile585Val mutan (B).



Gambar 12. Model 3D protein TRPV1 yang diperoleh dari PDB (**3J5P**).

### Analisis Protein TRPV1: Struktur Sekunder dan 3D

Struktur sekunder protein TRPV1 dan TRPV1 Ile585Val diperoleh dari <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk> menu PSIPRED. Struktur sekunder protein tersebut tersusun atas lipatan rantai polipeptida yang menghasilkan berbagai bentuk seperti:  **$\alpha$ -heliks** (berbentuk pilinan rantai asam amino yang membentuk spiral); bentuk  **$\beta$ -strand** (berupa lembaran lebar yang tersusun dari sejumlah asam amino yang saling terikat melalui ikatan hydrogen) dan struktur berbentuk **koil** (menyerupai tali) (Gambar 11). Mutasi berdasarkan SNP rs8065080 yang terdapat pada urutan asam amino 585 pada struktur  $\alpha$ -heliks pada protein TRPV1 mutan, relatif tidak merubah struktur sekunder protein.

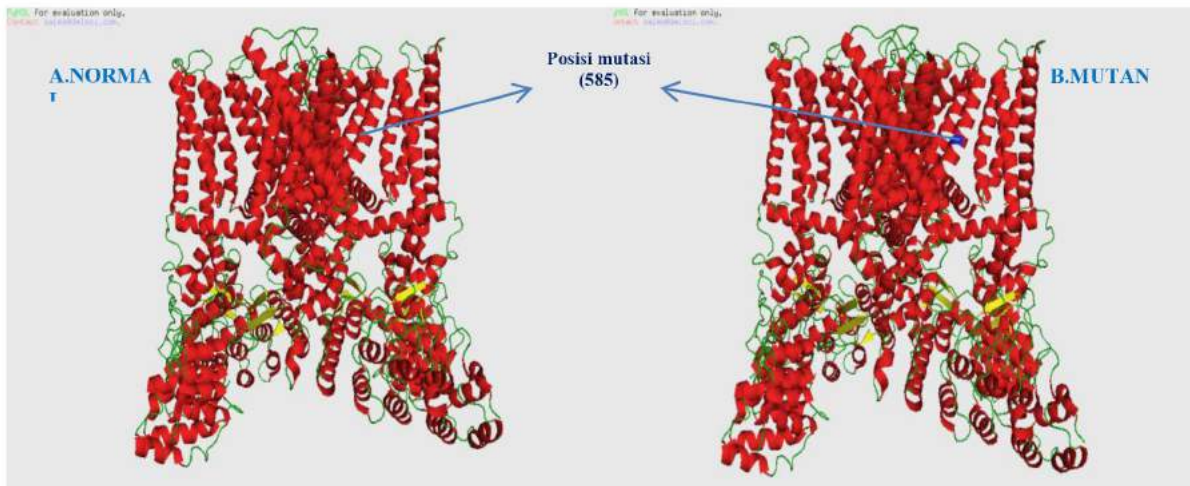
### Analisis Struktur Protein

Untuk memperoleh struktur tiga dimensi (3D) protein TRPV1, maka dilakukan proses modeling menggunakan sekuen protein TRPV1 sebagai cetakan (*template*). Menggunakan situs <http://www.rcsb.org/pdb> maka struktur kristal yang terbentuk tersimpan dalam format file

Protein Data Bank (PDB). (Proses modeling dapat juga dilakukan dengan mengirimkan sekuen protein ke <http://www.expasy.org> menu SwissModel. Hasil yang diperoleh adalah data protein TRPV1 dikenali sebagai protein dengan model/kode **3J5P**. (Gambar 12).

Selanjutnya hasil homologi modeling dilanjutkan dengan proses visualisasi menggunakan software *Pymol*. Hasil modeling 3 dimensi memperlihatkan tidak ada perbedaan struktur pada protein TRPV1 normal dengan protein TRPV1 Ile585Val mutan. Dengan struktur berdasarkan  **$\alpha$ -Heliks : (merah) ;  $\beta$ -strand : (kuning) & koil : (hijau)**. (Gambar 13)

Mutasi missense berdasarkan SNP rs8065080 yaitu Ile585Val terletak pada struktur 3D TRPV1 pada posisi asam amino 585 yang mengubah IsoLeusin menjadi Valin. Didapatkan analisis skoring matriks indeks BLOSUM perubahan Ile menjadi Val mempunyai skor 3. Ile dan Val keduanya sama-sama bersifat non polar dan alifatik. Dari hal-hal tersebut bermakna bahwa kedua asam amino tersebut relatif memiliki kesamaan. Jadi mutasi yang terjadi cenderung tidak merubah struktur protein TRPV1, karena sifat asam amino yang



**Gambar 13.** Struktur 3D protein TRPV1 normal (A) dan TRPV1 Mutan (B)

berubah, relatif tidak memiliki perbedaan.

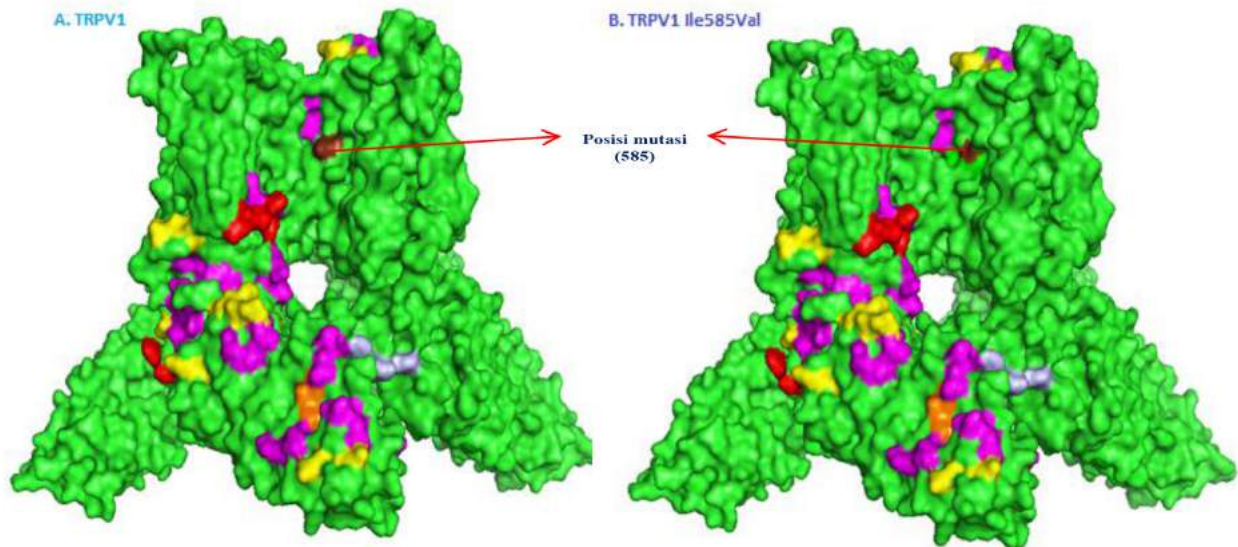
Untuk melakukan analisis fungsi protein mutan, maka dapat dilakukan terlebih dahulu pencarian situs aktif protein TRPV1 normal melalui <http://www.expasy.org> menu PROSITE. Dari hasil penelusuran melalui menu PROSITE tersebut didapatkan bahwa protein TRPV1 memiliki **6 situs aktif**, yaitu: [1]. *cAMP -& cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site* (CAMP\_PHOSPHO\_SITE pada posisi basa 2-5,368-371,499-502); [2]. *Casein Kinase II Phosphorylation site* (CK2\_PHOSPHO\_SITE pada basa 5-8, 20-23, 117-120, 145-148, 186-189, 194-197, 279-282,..., 510-513, 597-600, 634-637, 705-708, 801-804); [3]. *Protein Kinase C Phosphorylation Site* (PKC\_PHOSPHO\_SITE pada posisi basa 42-44,...,502-504,613-615,...,777-779,...,821-823); [4]. *N-Myristoylation site* (MYRYSTYL pada basa 169-174,765-770,769-774); [5]. *N-glycosylation site* (ASN\_GLYCOSYLATION pada basa 171-174, 192-195, 604-607, 749-752); [6]. *Tyrosine Kinase phosphorylation site* (TYR\_PHOSPHO\_SITE pada basa 368-375, 622-628). (**Gambar 14**).

Pada posisi residu 585 tempat terjadinya perubahan dari Ile menjadi Val tidak

terletak pada situs aktif TRPV1, situs aktif yang berdekatan dengan titik mutasi tersebut adalah CK2\_PHOSPHO\_SITE (*Casein Kinase II Phosphorylation site*). Pada mamalia Kasein-kinase adalah serin / treonin kinase yang terlibat dalam proses fosforilasi berbagai kegiatan sinyal yang meliputi proses diferensiasi sel, proliferasi, apoptosis, irama sirkadian dan transport membran. Situs Casein-Kinase fosforilasi memainkan peran fisiologis penting dalam proses signaling nyeri neuropatik dan menjadi pemikiran pula bahwa pada situs aktif CK2 tersebut dapat menjadi target dalam proses perancangan obat anti nyeri.<sup>29</sup> Jadi kemungkinan pada posisi asam amino 585 tersebut berhubungan dengan patofisiologi secara molekuler proses rasa nyeri pada OA sendi lutut.

#### **Identifikasi TRPV1 Ile585Val: disain Primer dan situs restriksi**

Disain primer merupakan proses awal yang penting dalam melakukan polymerase chain reaction (PCR) yang sesuai dengan target amplifikasi yang diperlukan. Untuk mendisain primer dapat dilakukan melalui situs <http://www.ncbi.nlm.gov> menu *Pick*



Gambar 14. Struktur 3D protein TRPV1 normal (A) dan TRPV1 mutan (B). Situs aktif → Merah: CAMP; Ungu: CK2; Kuning: PKC; Nila: Myristoilasi; jingga: ASN-glykosilasi; silver: Tyrosin kinase.

Tabel 2. Hasil Disain Primer TRPV1 dari Fasta mRNA (NM\_080704.3).

Forward primer	Reverse primer
5' ACCTGTGCCGTTTCATGTTTG 3'	3' GCTGACCAAGTCATTACCTG 5'
Panjang 21 bp ;Tm 59.93; GC 47.62	Panjang 21 bp ;Tm 58.99 ; GC 52.38

*Primer- PrimerBLAST* dengan memasukkan data fasta refseq Genom atau mRNA. Pemilihan pasangan primer ditentukan oleh panjang basa primer, suhu *melting (TM)*, banyaknya kandungan GC dan konsentrasi primer.<sup>30</sup> Hasil dari proses disain primer dengan fasta mRNA (NM\_080704.3) diperoleh beberapa pasang primer, yang dipilih diantaranya adalah:

Selanjutnya kedua primer dianalisis menggunakan software *PerlPrimer*, hasilnya primer memiliki  $\Delta G \leq -3$ , yang artinya kedua primer relatif stabil. Dilanjutkan dengan pencarian enzim restriksi untuk mengenali mutasi TRPV1 Ile585Val menggunakan situs *REBASE* dan software *NEBcutter*. Dengan memasukkan data fasta mRNA (NM\_080704.3) dengan letak mutasi pada posisi 2028 yang mengubah ATC menjadi GTC (*gambar 15*) ke dalam software, maka diperoleh enzim restriksi untuk mutasi

Ile585Val adalah *Hpy99I*. Mutasi TRPV1 Ile585Val dapat dideteksi dengan metode *Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)* menggunakan enzim restriksi *Hpy99I (gambar 16)*. Enzim ini akan memotong situs G pada ujung 3' dengan pola pemotongan menggantung pada ujung 3' (*sticky ends*) atau (*cohesive ends*). Pola seperti ini akan lebih mudah menempel pada tahap annealing dengan pasangan DNA-nya karena adanya ikatan basa antara ujung-ujung yang menggantung.<sup>31</sup>

### Kesimpulan

Gen TRPV1 Homo sapiens NC\_000017.11 terletak pada kromosom 17 lokasi 17p13.2 terdiri atas 17 ekson dan 16 intron dengan panjang basa nukleotida 43966 bp, berbentuk DNA linear. Protein TRPV1 NP\_542435.2 mempunyai 839 asam amino,

## Homo sapiens transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (TRPV1), transcript variant 1, mRNA

NCBI Reference Sequence: NM\_080704.3

Go to: 

```

LOCUS       NM_080704                4191 bp    mRNA    linear    PRI 30-JAN-2016
DEFINITION Homo sapiens transient receptor potential cation channel subfamily
            V member 1 (TRPV1), transcript variant 1, mRNA.
ACCESSION   NM_080704 XM_005256783
VERSION     NM_080704.3  GI:117306161

1921 ggaccaacat gctctactac acccgcggtt tccagcagat gggcatctat gccgtcatga
1981 tagagaagat gatcctgaga gacctgtgcc gtttcatgtt tgtctatc atc gtcttcttgt
2041 tcgggttttc cacagcgggtg gtgacgctga ttgaagacgg gaagaatgac tccctg<b>c</b>gt
2101 ctgagtcac  gt<b>c</b>gcacagg tggcgggggc ctgcctgcag gccccccgat agctcctaca
    
```

TITIK MUTA tS tTTI [2028]

**Gambar 15.** Refseq mRNA (NM\_080704.3) TRPV1 Homo sapiens. Dengan titik mutasi pada posisi basa 2028 yang mengubah kodon ATC menjadi GTC.

NEBcutter

## Hpy99I

```

5' ... C G W C G  ▾  ... 3'
3' ... ▲ G C W G C  ... 5'
    
```

**Gambar 16.** Enzim restriksi **Hpy99I**. Yang memotong ikatan basa G pada ujung 3' dengan pola pemotongan menggantung pada ujung 3' (*sticky ends*) atau (*cohesive ends*).

berbentuk linear dengan berat molekul 95kDa, terletak pada membran sel dan merupakan protein integral transmembran. Struktur terdiri atas heliks, koil dan strands. Fungsi TRPV1 adalah sebagai tempat ikatan ATP, kanal ion kalsium, tempat ikatan phosphoprotein, reseptor signal transmembran, termoreseptor dan nosiseptif reseptor. Secara umum TRPV1 merupakan protein transmembran. Mutasi **TRPV1 Ile585Val** dapat dianalisis dengan cara amplifikasi target sekuens yang dicari dan membuat disain primernya. Titik mutasi dideteksi menggunakan enzim restriksi yang mengenali titik mutasinya tersebut. Ile585Val merupakan mutasi *missense* yang terjadi pada posisi mRNA titik 2028,

yang mengubah kodon **ATC** menjadi **GTC**, mengubah translasi protein pada posisi 585 yaitu *Isoleusin* menjadi *Valin*. Mutasi yang terjadi cenderung tidak merubah struktur protein TRPV1, karena sifat asam amino yang berubah relatif sama. Titik mutasi terjadi didekat situs fosforilasi Casein kinase II (CK2) yang terlibat dalam proses fosforilasi berbagai kegiatan sinyal yang meliputi proses diferensiasi sel, proliferasi, apoptosis, irama sirkadian dan transport membran. Situs Casein-Kinase phosphorilasi memainkan peran fisiologis penting dalam proses sinyal nyeri neuropatik. Patofisiologi molekuler arthritis tampaknya berhubungan dengan proses yang terjadi akibat mutasi pada titik tersebut.

## Daftar Pustaka

1. Ganong WF. Buku ajar Fisiologi Kedokteran. ed 22. Jakarta: EGC. 2008
2. Brauchi S, Orta G, Mascayano C, Salazar M, Raddatz N, Urbina H, *et al.* Dissection of the components for PIP2 activation and thermosensation in TRP channels. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2007; 104 (24): 10246–51.
3. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 1997;389 (6653): 816–24.
4. Xue Q, Yu Y, Trilk SL, Jong BE, Schumacher MA. The genomic organization of the gene encoding the vanilloid receptor: evidence for multiple splice variants. *Genomics*. 2001;76 (1-3): 14–20.
5. Clapham DE, Julius D, Montell C, Schultz G. International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels. *Pharmacol. Rev.* 2005;57 (4): 427–50.
6. Nabissi M, Santoni G. TRPV1 (transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. 2011;15 (7): 588-95.
7. Everaerts W, Gees M, Alpizar YA, Farre R, Leten C, Apetrei A, *et al.* The capsaicin receptor TRPV1 is a crucial mediator of the noxious effects of mustard oil. *Curr Biol*. 2011;21 (4): 316–21.
8. Cui M, Honore P, Zhong C, Gauvin D, Mikusa J, Hernandez G, *et al.* TRPV1 receptors in the CNS play a key role in broad-spectrum analgesia of TRPV1 antagonists. *J Neurosci*. 2006;26 (37): 9385–93.
9. Huang SM, Bisogno T, Trevisani M, Al-Hayani A, De Petrocellis L, Fezza F, *et al.* An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc Natl Acad Sci*. 2002; 99 (12): 8400–5.
10. Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, *et al.* Global and regional burden of disease and risk factor. *Lancet*. 2006;367:1747-57.
11. Duncan R, Peat G, Thomas E, Hay E, McCall I, Croft P. Symptoms and radiographic osteoarthritis: not as discordant as they are made out to be? *Ann Rheum Dis*. 2007; 66 (1): 86-91.
12. Foulkes T, Wood JN. Pain Genes. *PLoS Genet*. 2008;4:e1000086.
13. Huang J, Zhang X, McNaughton PA. Inflammatory pain: the cellular basis of heat hyperalgesia. *Curr Neuropharmacol*. 2006; 4: 197-206.
14. Fernihough J, Gentry C, Bevan S. Regulation of calcitonin gene-related peptide and TRPV1 in rat model of osteoarthritis. *Neurosci Lett*. 2005; 388: 75-80.
15. Zhang RX, Ren K, Dubner R. Osteoarthritis pain mechanisms: basic studies in animal models. *Osteoarthritis Cartilage*. 2013; 21: 1308 – 15.
16. Gavenis K, Schumacher C, Schneider U, Eisfeld J, Mollenhauer J, Schmidt-Rohlfing B. Expression of ion channel of the TRP family in articular chondrocytes from osteoarthritic patients: changes between native and in vitro propagated chondrocytes. *Mol Cell Biochem*. 2009; 321:135-43.
17. Idris AL, Landao-Bassonga E, Ralston SH. The TRPV1 ion channel antagonist capsazepine inhibits osteoclast and osteoblast differentiation in vitro and ovariectomy induced bone loss in vivo. *Bone*. 2010;46:1089-99.
18. Engler A, Aeschlimann A, Simmen BR, Michel BA, Gay RE, Gay S, *et al.* Expression of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) in synovial fibroblast from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 359: 884-8.
19. Kim H, Neubert JK, San Miguel A, Xu K, Krishnaraju RK, Iadarola MJ, *et al.* Genetic influence on variability in human acute experimental pain sensitivity associated with gender, ethnicity and psychological temperament. 2004. *Pain*; 109: 488-96.
20. Lotsch J, Fluhr K, Neddermayer T, Doehring A, Geisslinger G. The consequence of concomitantly present functional genetic variants for the identification of functional genotype-phenotype association in pain. *Clin Pharmacol Ther*. 2009.; 85:25-30.
21. Valdes AM, Wilde GW, Doherty SA, Lories RJ, Vaughn FL, Laslett LL, *et al.* The Ile585Val TRPV1 variant is involved in risk of painful knee osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2011; 70: 1556-61.
22. Valdes AM, Spector TD. The clinical relevance of genetic susceptibility to osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2010;24:3-14.
23. Gina M. The emerging role of TRP channels in mechanisms of temperature and pain sensation. *Curr Neuropharmacol*. 2006;4:183-96.
24. Elokely K, Velisetty P, Delemotte L. Understanding TRPV1 activation by ligands: Insights from the binding modes of capsaicin and resiniferatoxin. *PNAS*. 2015;E137–E145
25. Wang Y. The functional regulation of TRPV1 and its role in pain sensitization. *Neurochem Res*. 2008;33:2008–12.



26. Cortright DN, Crandall M, Sanchez JF, Zou T, Krause J.E, White G. The tissue distribution and functional characterization of human VR1. *Biochem. Biophys Res Commun.* 2001; 281:1183-9.
27. Staender S, Moormann C, Schumacher M, Buddenkotte J, Artuc M, Shpacovitch V, *et al.* Expression of vanilloid receptor subtype 1 in cutaneous sensory nerve fibers, mast cells, and epithelial cells of appendage structures. *Exp Dermatol.* 2004; 13:129-39.
28. Valdes AM, Spector TD, Doherty S, Wheeler M, Hart DJ, Doherty M. Association of the DVWA and GDF5 polymorphisms with osteoarthritis in UK population. *Ann Rheum Dis.* 2009;68:1916-20.
29. Sakurai E, Kurihara T, Kouchi K, Saegusa H, Zong S, Tanabe T. Upregulation of casein kinase 1 $\epsilon$  in dorsal root ganglia and spinal cord after mouse spinal nerve injury contributes to neuropathic pain. *Molecular Pain.* 2009;5:74.
30. Fatchiyah. *Prinsip Dasar Bioinformatika.* Universitas Brawijaya Press (UB Press). 2015
31. Marshall JT, Gowers DM, Halford SE. Restriction Endonucleases that Bridge and Excise Two Recognition Sites from DNA. *J Mol Biol.* 2007 Mar 23; 367(2): 419–31.