

## Pelacakan Protein *Wingless-Type MMTV Integration Site Family Member-4* pada Uterus Mencit

(*DETECTION WINGLESS-TYPE MMTV INTEGRATION SITE FAMILY MEMBER-4 PROTEIN OF MOUSE UTERUS*)

Agung Janika Sitaswi<sup>1</sup>, Wayan Tunas Artama<sup>2</sup>,  
Agung Budiyanto<sup>3</sup>, Edy Dharmana<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Mahasiswa S3 Program Studi Sains Veteriner  
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada;  
Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Matematika  
Universitas Diponegoro, Semarang

<sup>2</sup>Bagian Biokimia, <sup>3</sup>Bagian Reproduksi, FKH UGM  
Jln Fasuna No 2, Kampus UGM Yogyakarta 55281  
Email : agssiwi@yahoo.co.id.

<sup>4</sup>Bagian Parasitologi, Fakultas Kedokteran  
Universitas Diponegoro Semarang

### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi ekspresi protein *Wingless-type MMTV integration site family member 4 (wnt4)* pada uterus mencit galur Swiss Webster. Hewan uji yang digunakan adalah mencit dewasa kelamin dengan bobot berkisar 25-30 gram. Mencit dipelihara dan dikawinkan dalam kondisi laboratorium yang terkontrol. Kebuntingan ditentukan dengan adanya sumbat vagina/*vaginal plug* pada mencit betina setelah dikawinkan. Protein diisolasi dari sampel uterus yang diambil dari mencit bunting tujuh hari, setelah mencit tersebut dikorbankan nyawanya dengan cara dislokasio servikalis. *Immunoblotting* dilakukan menggunakan kit *Chemiluminescent Western Blot*. Antibodi primer yang digunakan adalah *antibody anti-wnt-4* dengan pengenceran 1:1000. Hasil penelitian ini menunjukkan pita protein dengan bobot molekul berkisar 40 kDa menunjukkan reaksi positif terhadap antibodi yang digunakan, sehingga dapat disimpulkan bahwa protein tersebut adalah protein *wnt4*.

Kata kunci : *Wnt4*, *immunoblotting*, *Swiss Webster*

### ABSTRACT

The aims of this study was to detect the expression of *Wingless-type MMTV integration site family member 4 (Wnt4)* protein in the uterus of Swiss Webster mice. Laboratory animals that were used are adult Swiss Webster mice weighing 25-30 grams. Mice were kept and mated in a controlled laboratory conditions. Pregnancy was determined by the presence of vaginal plug in female mice after breeding. Protein was isolated from the uterus at seven days of gestation. *Immunoblotting* was performed using *Chemiluminescent Western Blot* kit. The primary antibody used was anti *Wnt-4* antibody with a 1: 1000 dilution. The results showed protein bands with molecular weights ranging from 40 kDa showed a positive reaction to the primary antibody that were used so that it can be concluded that the protein is *Wnt4* protein.

Keywords : *Wnt4*, *immunoblotting*, *Swiss Webster*

### PENDAHULUAN

Gen *wingless-type MMTV integration site family member (wnt)* merupakan gen yang meregulasi proses implantasi embrio (Muhamed *et al.*, 2004; Lloyd *et al.*, 2005; Hayashi *et al.*, 2009). Menurut Muhamed *et al.* (2004) bahwa saat ini telah ditemukan 19 jenis gen *wnt*.

Selama proses implantasi embrio pada mencit dapat dideteksi ekspresi beberapa macam gen *wnt*, yaitu gen *wnt4*, *wnt5*, *wnt7a*, *wnt7b*, *wnt11*, serta *wnt16*. Hayashi *et al.* (2009) menyatakan bahwa gen *wnt4* merupakan regulator yang penting dalam proses implantasi embrio mencit. Hasil penelitian Hayashi *et al.* (2009) tersebut juga menunjukkan bahwa ekspresi *wnt4* hanya

terjadi pada *implantation site*, dan tidak ditemukan pada *nonimplantation site*.

Gen *wnt* merupakan gen yang mengkode glikoprotein yang kaya sistein. Protein tersebut berperan sebagai molekul sinyal dan berperan dalam sejumlah proses perkembangan seluler (Hayashi *et al.*, 2009; Saito-Diaz *et al.*, 2010; Boerboom, 2011; Lapointe *et al.*, 2012). Protein *wnt* melalui sistem sinyal seluler berperan dalam proses perkembangan fundamental yaitu determinasi nasib sel, proliferasi, polaritas, dan kematian sel selama perkembangan embrio (He *et al.*, 1997; Paria *et al.*, 2002; Miller, 2002; Saito-Diaz, 2013). Sonderegger *et al.* (2010) menyatakan bahwa sistem sinyal yang diregulasi oleh protein *wnt* berperan dalam perkembangan embrio, dalam aktivasi blastosis, implantasi, dan desidualisasi. McAuley *et al.* (2013) menunjukkan bahwa sistem sinyal *wnt* terjadi sepanjang perkembangan embrio sehingga membuktikan bahwa sistem sinyal *wnt* memiliki sejumlah peran dalam perkembangan embrio.

Penelitian mengenai *wnt4* telah dilakukan oleh beberapa peneliti sejak beberapa tahun lalu. Bernard dan Harley (2007) serta Chang *et al.* (2012) meneliti sistem sinyal yang terlibat dalam aksi *wnt4* dalam pertumbuhan duktus Muller, perkembangan sistem saluran *sex-specific*, serta determinasi jenis kelamin. Rao *et al.* (2009) meneliti pengaturan ekspresi *wnt4* oleh estrogen pada epididimis kera dan rodensia. Jääskeläinen *et al.* (2010), Lapointe *et al.* (2012), Maatouk *et al.* (2013), dan Chen *et al.* (2015) meneliti peran *wnt4* mencit dalam seleksi dan maturasi oosit dan pembentukan serta maturasi folikel dalam ovarium mencit. Penelitian Coveney *et al.* (2008) menunjukkan bukti bahwa molekul *wnt4* berperan dalam perkembangan sistem saluran genitalia, dan diferensiasi testis mencit. Boerboom (2011) membuktikan bahwa *wnt4* diperlukan dalam steroidogenesis perkembangan folikel antral hewan betina, serta perkembangan epitel semeniferus pada hewan jantan. Filant *et al.* (2012) dan Wu *et al.* (2015) membuktikan bahwa ekspresi *wnt4* dipengaruhi oleh progesteron, sehingga memengaruhi proliferasi dan perkembangan kelenjar pada endometrium tikus.

Penelitian ini dilakukan untuk mendeteksi ekspresi protein yang disandi oleh gen *wnt4* pada uterus mencit (*M. musculus* L.) galur Swiss Webster secara *in vivo*. Deteksi ekspresi tersebut dilakukan dengan metode *immunoblotting* dengan antibodi anti-*wnt4*. Keberhasilan

penelitian membuka peluang untuk melakukan rekayasa gen penyandi protein *wnt4* untuk kepentingan studi dalam reproduksi mamalia, khususnya dalam proses implantasi embrio. Penelitian ini bertujuan melacak ekspresi *wnt4* pada uterus mencit.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan dalam tiga tahapan yaitu, pemeliharaan hewan uji, elektroforesis, serta *blotting* protein uterus yang berasal dari uterus mencit (*M. musculus* L.) Swiss Webster. Pemeliharaan hewan uji dilakukan di LPPT Unit Pemeliharaan Hewan Percobaan UGM; elektroforesis dilakukan di Laboratorium Biokimia FKH UGM; *blotting* dan visualisasi hasil *blotting* yang dilakukan di Laboratorium Fasilitas Penelitian Bersama, Fakultas Biologi UGM.

Hewan uji untuk penelitian ini adalah mencit betina dara/*virgin* dengan rata-rata bobot badan berkisar 25-30 gram dan diadaptasi selama tujuh hari (Lloyd *et al.*, 2003; Hardy *et al.*, 2004). Hewan uji dikawinkan dengan cara menggabungkan empat ekor mencit betina dengan satu ekor mencit jantan dalam satu kandang. Penggabungan hewan uji jantan dan betina dilakukan pada saat hewan betina sedang mengalami fase estrus. Fase penyusutan siklus estrus hewan ditentukan dengan *vaginal smears* (ulas vagina). Mencit betina yang telah kawin ditandai dengan terbentuknya sumbat vagina (*vaginal plug*). Hari yang ditandai dengan terbentuknya sumbat vagina pada hewan coba diasumsikan sebagai hari pertama kebuntingan.

Hari ke-tujuh setelah terbentuknya sumbat vagina, mencit betina bunting dikorbankan nyawanya dengan metode dislokasi cervicalis. Abdomen bagian bawah di-*sectio* dan uterus diisolasi dari pangkal uterus sampai dengan bagian *utero-tubal junction*. Uterus dibuka dengan arah longitudinal, endometrium dikerok (*scraped off*) perlahan-lahan. Sampel endometrium disimpan dalam tabung *eppendorf* pada suhu minus 20°C sampai isolasi protein dilakukan (Grummer *et al.*, 2004).

Uterus yang telah diisolasi, dihomogenisasi dengan larutan *phosphate buffered saline* (PBS) dengan perbandingan 1:1 (w/v). Sampel uterus dalam PBS selanjutnya dilakukan sentrifugasi bertahap, yaitu 700 g selama 10 menit pada suhu kamar, dilanjutkan dengan 10.000 g selama empat menit pada suhu 4°C. Kandungan

protein sampel ditentukan menggunakan *spectrofotometer* UV dengan  $\lambda 590$ . *Separating gel* elektroforesis yang digunakan dalam penelitian ini memiliki konsentrasi 12%, sedangkan konsentrasi *stacking gel* adalah 3%. *Loading* sampel dilakukan dengan jumlah 20  $\mu\text{L}$  yang terdiri dari 5  $\mu\text{L}$  *sample buffer* dan 15  $\mu\text{L}$  sampel protein. *Loading protein marker* (1<sup>st</sup> BASE) pada gel dilakukan dengan jumlah 6  $\mu\text{L}$ . Elektroforesis dilakukan selama 75 menit dengan kuat arus 60 mA dan tegangan 125 volt (Grummer *et al.*, 2004).

Gel hasil SDS-PAGE disusun pada *blotter* secara berurutan dengan posisi membran *polyvinyl difluoride* (PVDF) di bagian bawah gel. Bagian atas gel dan bagian bawah membran masing-masing dilapisi dengan tiga lembar kertas saring. Kertas saring, gel dan membran PVDF dibasahi dengan *blotting buffer*. *Blotting* gel pada membran PVDF dilakukan selama satu jam dengan kuat arus 54 ampere.

Membran hasil transfer diwarnai dengan pewarna *Ponceau* kemudian di-*destaining* dengan metanol. Membran direndam dalam *blocking solution* selama 30 detik, kemudian dicuci dua kali menggunakan air, masing-masing selama lima menit. Membran yang telah dicuci diinkubasi dengan antibodi primer (*antibody anti-wnt-4*, Santa Cruz Biotechnology, Cat.No.sc-376279) selama satu malam (*overnight*) pada suhu 4°C. Setelah membran diinkubasi dengan antibodi primer selama satu malam, dipindahkan pada *rotary shaker* selama satu jam, kemudian dicuci dengan *antibody wash* sebanyak tiga kali, masing-masing selama lima menit. Setelah dicuci, membran direndam dalam antibodi sekunder selama 30 menit. Membran dicuci kembali secara berurutan tiga kali dengan *antibody wash*, masing-masing selama lima menit, dilanjutkan dengan air sebanyak dua kali, masing-masing selama dua menit. Membran yang telah dicuci dengan air, ditempatkan pada plastik mika dan dibasahi dengan *chemiluminescent substrate*. Visualisasi membran dilakukan dengan menempelkan membran film *X-ray* dengan beberapa posisi, masing-masing selama satu menit, di dalam ruang gelap. Visualisasi dilakukan dengan mencelupkan film *X-ray* secara berurutan pada larutan *fixier*, larutan asam asetat, dan larutan *developer* sampai muncul warna/blok hitam pada *X-ray film*.

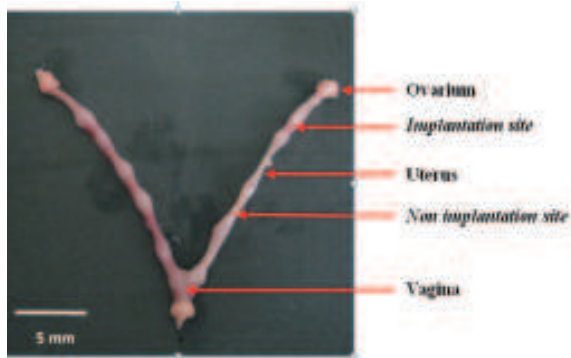
## HASIL DAN PEMBAHASAN

Uterus mencit yang diisolasi pada umur kebuntingan tujuh hari disajikan pada Gambar 1. Penentuan sampel yang diambil dari uterus mencit pada umur kebuntingan tujuh hari dilakukan berdasar hasil penelitian Muhammed *et al.* (2004) yang menyatakan bahwa ekspresi *wnt4* kuat sampai umur kebuntingan tujuh hari. Ekspresi gen *wnt4* pada hari ke tujuh kebuntingan menurut Hayashi *et al.* (2009) terjadi 15 kali lebih besar daripada hari pertama kebuntingan. Selain hal tersebut, Sitaswi dan Djaelani (2011) dengan menggunakan mencit (*Mus musculus*) sebagai hewan coba menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan ekspresi protein yang diambil pada hari kebuntingan ke 3-5.

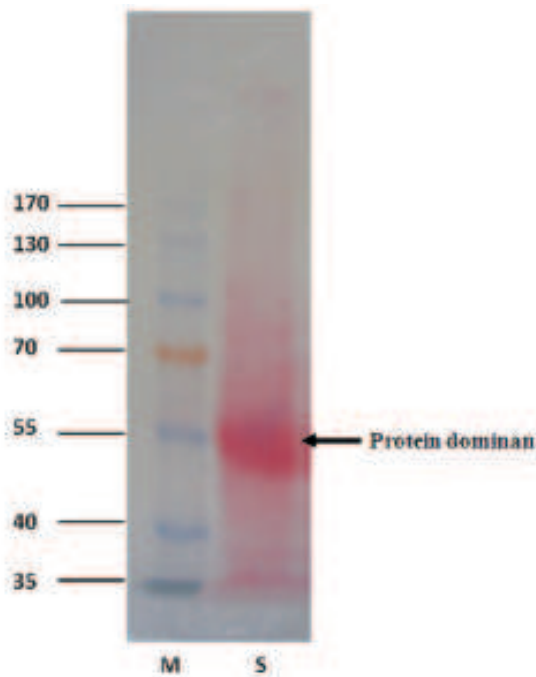
Membran hasil *blotting* dengan pewarnaan *Ponceau* disajikan pada Gambar 2. *Protein marker* (kolom pertama) sudah terseparasi dengan sempurna sehingga dapat diartikan bahwa prosedur elektroforesis dilakukan dengan benar. *Band* protein marker dari atas ke bawah menunjukkan ukuran bobot molekul protein secara berurutan dari 170, 130, 100, 70 (*band* berwarna merah), 55, 40, 35 kDa. Gambar tersebut juga menunjukkan terdapat *band* berwarna merah pada kolom dua, tiga dan empat. Hal tersebut membuktikan bahwa kondisi *blotting* yang dilakukan cukup optimal untuk memindahkan protein dari gel ke membran.

Pewarnaan *Ponceau* merupakan teknik pewarnaan yang *reversible* sehingga memungkinkan untuk dilakukan deteksi berikutnya pada membran yang sama. Pewarna *Ponceau* merupakan pewarna negatif yang berikatan dengan muatan positif protein. Pewarna *Ponceau* juga berikatan non kovalen dengan gugus nonpolar protein. Batas protein setelah pemisahan elektroforesis dan dipindah ke membran untuk pewarnaan ini adalah 250 ng. Berdasar hal tersebut, *band* berwarna merah dengan ukuran sekitar 55 kDa (Gambar 2.) diduga merupakan protein dominan dengan jumlah yang cukup melimpah, melebihi 250 ng.

Hasil *immunoblotting* menggunakan *antibody anti-wnt4* dengan visualisasi menggunakan *X-ray film* menunjukkan *band* target terekspresi pada kolom ke-2 (sampel). Xiong *et al.* (2009) menyatakan bahwa pewarnaan

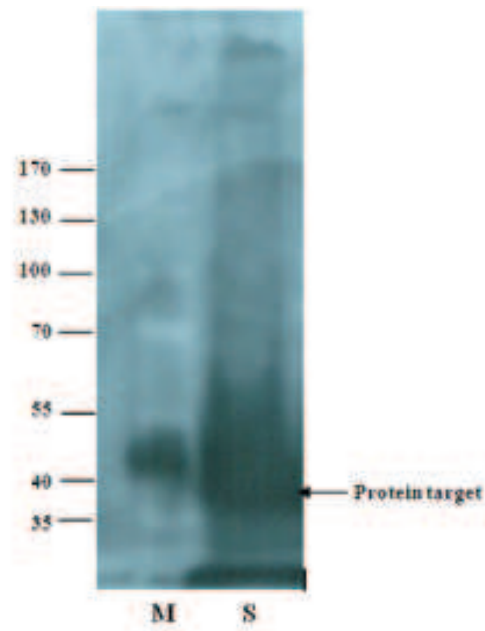


Gambar 1. Anatomi sistem reproduksi mencit pada umur kebuntingan tujuh hari.



Gambar 2. Membran hasil pewarnaan *Ponceau* setelah *blotting* Keterangan: M: Protein Marker (kDa); S: Sampel uterus mencit pada umur kebuntingan tujuh hari. *Band* berwarna merah pada kolom kedua (S) menunjukkan protein yang terekspresi dominan, memiliki bobot molekul 55 kDa.

*chemiluminescence* terjadi saat molekul yang teroksidasi, misalnya peroksida, bereaksi dengan molekul yang lain. Ikatan di antara dua atom oksigen pada peroksida relatif lemah, pada saat ikatan lepas atom akan menyusun dirinya kembali, melepaskan energi dalam bentuk cahaya. Emisi cahaya tersebut yang ditangkap oleh *X-ray film*.



Gambar 3. Hasil visualisasi *immunoblotting* pada *X-ray film* Keterangan : M: Protein marker ; S: Sampel uterus mencit pada umur kebuntingan tujuh hari. *Band* protein target pada kolom ke-2 (S) menunjukkan reaksi positif terhadap antibodi primer yang digunakan dalam penelitian terkespresi dengan ukuran berkisar 40 kDa.

Hasil *immunoblotting* pada penelitian ini juga membuktikan terdapat *band* yang menunjukkan reaksi positif kuat terhadap antibodi primer yang digunakan untuk deteksi ekspresi protein *wnt4*. Apabila dibandingkan dengan *protein marker*, maka *band* yang terekspresi pada semua sampel berada pada posisi di antara *band* dengan bobot molekul 35 dan 40 kDa. Hasil ini menunjukkan perbedaan dengan pewarnaan *Ponceau* pada Gambar 2. *Band* pada Gambar 3 tidak terdeteksi dengan pewarnaan *Ponceau* sehingga diasumsikan bahwa jumlah protein *wnt4* relatif kecil (kurang dari 250 ng).

Coudreuse dan Korswagen (2007) menyatakan bahwa sebagian besar protein *wnt* tersusun atas 350 asam amino dan memiliki bobot molekul sekitar 40 kDa. Kemp *et al.* (2007) menyatakan bahwa gen *wnt* mengkode protein sekretori yang tersusun atas 350-400 asam amino dengan 22 sistein yang *conserved*. Berdasar hal tersebut maka dapat diyakini bahwa protein yang terekspresi setelah uji

*immunoblotting* (Gambar 3) adalah protein *wnt4*.

Sampel pada penelitian ini diisolasi dari uterus mencit pada umur kebuntingan tujuh hari. Perkembangan embrio mencit pada umur kebuntingan 6,5 hari ditandai dengan posisi embrio terhubung dengan epitel luminal dan terjadi pemecahan penghubung jaringan uterus. Selanjutnya pada umur kebuntingan 7,5 hari, embrio telah membentuk interkoneksi lebih luas dengan endometrium uterus (Miyakoshi *et al.*, 2009), proses ini dikenal sebagai tahap invasi embrio (Sharkey dan Smith, 2003; Hayashi *et al.*, 2009). Mulai umur kebuntingan tujuh hari, embrio juga telah mulai mengalami diferensiasi lapis benih jaringan embrional menjadi ektoderm, mesoderm, dan endoderm (Miyakoshi *et al.*, 2009). Sharkey dan Smith (2003) dan Hayashi *et al.* (2009) menyatakan bahwa proses tersebut terjadi bersamaan dengan proliferasi dan diferensiasi sel-sel stroma menjadi sel-sel desidual sehingga membentuk hubungan vaskuler embrio dengan induk.

Tahap perkembangan yang terjadi pada embrio umur kebuntingan hari ke tujuh merupakan tahap yang ditandai dengan mekanisme proliferasi, migrasi, dan diferensiasi sel-sel penyusun tubuh embrio. Proses mendasar ini merupakan hasil regulasi sejumlah *ligand* yang teraktivasi oleh protein hasil ekspresi gen *wnt*, termasuk *wnt4* (Coudreuse dan Korswagen, 2007). Ekspresi protein *wnt4* dalam penelitian ini membuktikan bahwa protein tersebut memiliki peran yang esensial dalam proses implantasi embrio mencit. Miyakoshi *et al.* (2009) menyatakan bahwa protein *wnt4* merupakan faktor tumbuh yang berperan dalam proses perkembangan embrio. Daikoku *et al.* (2004) berpendapat bahwa sistem sinyal *wnt4* bersama dengan *bone morphogenetic protein* (BMP) dan *fibroblast growth factor* (FGF) membantu orientasi embrio pada ruang implantasi.

Ekspresi protein yang terjadi merupakan bukti bahwa individu yang bersangkutan memiliki gen penyandi protein tersebut. Keberhasilan deteksi protein *wnt4* pada mencit Swiss Webster membuka peluang untuk dilakukan penelitian lanjutan dengan fokus pada rekayasa gen dan atau protein agar proses perkembangan yang diregulasi oleh gen *wnt4* dapat dipelajari secara menyeluruh. Rekayasa juga dapat dilakukan dengan kloning gen untuk memproduksi protein rekombinan yang dapat digunakan untuk mengatur satu atau beberapa tahap reproduksi hewan mamalia.

## SIMPULAN

Hasil penelitian ini menunjukkan pita protein dengan bobot molekul berkisar 40 kDa menunjukkan reaksi positif terhadap antibodi yang digunakan sehingga dapat disimpulkan bahwa ekspresi protein *wnt4* pada mencit Swiss Webster pada umur kebuntingan tujuh hari telah berhasil dideteksi menggunakan teknik *immunoblotting*.

## SARAN

Penelitian lebih lanjut dapat diarahkan untuk merekayasa gen penyandi protein *wnt4* melalui kloning gen *wnt4* serta menguji ekspresi protein rekombinan secara *in vitro*.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Direktur BPPS, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan Republik Indonesia yang telah memberikan bantuan dana pendidikan selama masa studi dari tahun 2009-2014 di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bernard P, Harley VR. 2007. Wnt4 action in gonadal development and sex determination. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39: 31–43.
- Boerboom D. 2011. The Yin and Yang of WNT4 Signaling in the Adult Gonad. *Biol Reprod* 85: 149.
- Chang X, Qin Y, Xu C, Li G, Zhao X, Chen Z. 2012. Mutations in WNT4 are not responsible for Müllerian duct abnormalities in Chinese women. *Reproductive BioMedicine Online* 24: 630–633.
- Chen JG, Chen T, Ding Y, Han L, Zhou FY, Chen WZ, Ding MX. 2015. Baicalin can attenuate the inhibitory effects of mifepristone on Wnt pathway during peri-implantation period in mice. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 149: 11–16.

- Coudreuse D, Korswagen HC. 2007. The making of *Wnt*: new insights into *Wnt* maturation, sorting and secretion. *Development* 134: 3-12.
- Coveney D, Ross AJ, Slone JD, Capel B. 2008. A microarray analysis of the XX *Wnt4* mutant gonad targeted at the identification of genes involved in testis vascular differentiation. *Gene Expression Patterns* 8: 529–537.
- Daikoku T, Song H, Guo Y, Riesewijk A, Mosselman SK, Das D, Dey DK. 2004. Uterine *Msx-1* and *Wnt4* signaling becomes aberrant in mice with the loss of leukemia inhibitory factor or *Hoxa-10*: Evidence for a novel Cytokine-Homeobox-*Wnt* signaling in implantation. *Molecular Endocrinology* 18(5): 1238–1250.
- Filant J, Zhou H, Spencer TE. 2012. Progesterone Inhibits Uterine Gland Development in the Neonatal Mouse Uterus. *Biol Reprod* 86(5):146, 1–9.
- Grummer R, Hewitt SW, Traub O, Korach KS, Wittenhager E. 2004. Different Regulatory Pathways on Endometrial Connexin Expression: Preimplantation Hormonal-Mediated Pathway versus Embryo Implantation-Mediated Pathway. *Biol Reprod* 71: 273–281.
- Hardy CM, Clysdale G, Mobbs KJ. 2004. Development of the mouse-specific contraceptive vaccines: Infertility in mice immunized with peptide and polyepitope antigens. *Reprod* 128: 395–407.
- Hayashi K, Erikson DW, Tilford SA, Bany BM, Maclean JA, Rucker EB, Johnson GA, Spencer TE. 2009. *Wnt* genes in the mouse uterus: Potential regulation of implantation. *Biol Reprod* 88: 989–1000.
- He X, Saint-Jeannet JP, Wang Y, Nathans J, Dawid I, Varmus H. 1997. A member of the Frizzled protein family mediating axis induction by *Wnt-5a*. *Science*. 275: 1652–1654.
- Jääskeläinen M, Prunskaitė-Hyyryläinen R, Naillat F, Parviainen H, Anttonen M, Heikinheimo M, Liakkae A, Olai R, Vainio S, Vaskivuo TE, Tapanainen JS. 2010. WNT4 is expressed in human fetal and adult ovaries and its signaling contributes to ovarian cell survival. *Molecular and Cellular Endocrinology* 317: 106–111.
- Kemp CR, Hendrickx M, Willems E, Wawrzak D, Metioui M, Leyns L. 2007. The roles of *Wnt* signaling in early mouse Development and Embryonic Stem Cells. *Functional Development and Embryology*.
- Lapointe E, Boyer A, Rico C, Paquet M, Franco HL, Gossen J, DeMayo FJ, Richards JS, Boerboom D. 2012. FZD1 Regulates Cumulus Expansion Genes and Is Required for Normal Female Fertility in Mice. *Biology of Reproduction* 87(5): 104, 1–12.
- Lloyd ML, Shellam GR, Papadimitriou JM, Lawson MA. 2003. Immunocontraception is induced in BALB/c mice inoculated with murine cytomegalovirus expressing mouse zona pellucida 3. *Biol Reprod* 68: 2024–2032.
- Maatouk DM, Mork L, Chassot A, Chaboissier MC, Capel B. 2013. Disruption of mitotic arrest precedes precocious differentiation and transdifferentiation of pregranulosa cells in the perinatal *Wnt4* mutant ovary. *Developmental Biology* 383: 295–306.
- McAuley BS, Akyar E, Filliger L, Hinman VF. 2013. Expression of *wnt* and *frizzled* genes during early sea star development. *Gene Expression Patterns* 13: 437–444.
- Miller JR. 2002. The *Wnts*. *Gen. Biol* 3: 3001-3015.
- Miyakoshi T, Kajiya H, Miyajima K, Takei M, Tobita M, Takekoshi S, Osamura RY. 2009. The Expression of *Wnt4* is regulated by estrogen via an estrogen receptor alpha-dependent pathway in rat pituitary growth hormone-producing cells. *Acta Histochem Cytochem* 42(6): 205–213.
- Muhamed OA, Dufort D, Clarke CJ. 2004. Experimental and estradiol regulation of *Wnt* genes in the mouse blastocyst. Identity a candidate pathway of embryo-maternal signalling at implantation. *Biol Reprod* 71: 417-424.
- Paria BC, Reece J, Das SK, Dey SK. 2002. Deciphering the cross-talk of implantation : advances and challenges. *Science* 296: 2185–2188.
- Rao AJ. 2009. Oestrogenic regulation and differential expression of *WNT4* in the bonnet monkey and rodent epididymis. *Reproductive BioMedicine Online* 18(4): 555-561.

- Saito-Diaz K, Abe H, Nakazawa M, Irokawa E, Watanabe M, Hosoi Y, Soma M, Kasuga K, Kojima I, Kobayashi M. 2010. Cloning of complementary DNAs encoding structurally related homeoproteins from preimplantation Mouse embryos: Their involvement in the differentiation of embryonic stem cells. *Biol Reprod* 82: 687–697.
- Saito-Diaz K, Chen TW, Wangi X, Thorne CA, Wallace HA, Page-McCawi A, Lee E. 2013. The way Wnt works: Components and mechanism. *Growth Factors* 31(1): 1–31.
- Sharkey AM, Smith SK. 2003. The endometrium as a cause of implantation failure. *Best Pract Res Clin Obst Gyn.* 17(2): 289–307.
- Sitasiwi AJ, Djaelani MA. 2011. Studi awal upaya eksplorasi agensia imunokontrasepsi untuk regulasi fertilitas hewan liar: Profil protein selama proses implantasi embrio mencit (*Mus musculus* L.) BALB/c. *Bioma* 13(1): 39–45.
- Sonderegger S, Pollheimer J, Knöfler M. 2010. Wnt Signalling in Implantation, Decidua-lisation and Placental Differentiation: A Review. *Placenta* 31: 839-847.
- Wu Z, Yuan M, Li Y, Fu F, Ma W, Li H, Wang W, Wang S. 2015. Analysis of *WNT4* polymorphism in Chinese Han women with endometriosis. *Reproductive Bio Medicine Online* XX: XX-XX. 8 February 2015. 8.13 am
- Xiong X, Ouyang J, Xiong X, Zhai S, Baeyens WRG. 2009. Chemiluminescence-based detection technologies for biomolecules, mainly in gel electrophoresis. Abstract. *Trends in Analytical Chemistry.* 28(8).