

**Diss. ETH No. 17287**

**Wnt/frizzled signaling during *Xenopus laevis* pronephric  
kidney organogenesis**

A dissertation submitted to the  
Swiss Federal Institute of Technology (ETH) Zürich

for the degree of  
**Doctor of Natural Sciences**

Presented by  
**Christophe Héliçon**

DEA biologie et santé  
Université de Rennes 1

Born December 4, 1977  
Citizen of France

Accepted on recommendation of

Prof. Dr. André Brändli, examiner  
Prof. Dr. Dario Neri, co-examiner  
Prof. Dr. Christoph Niehrs, co-examiner

2007

---

## Summary

In the present thesis, I took advantage of the *Xenopus* animal model to focus on Wnt and Frizzled (Fzd) gene functions during kidney organogenesis. Vertebrate kidney development is characterized by the formation of three distinct kidneys: the pronephros, the mesonephros, and the metanephros. While the pronephros is a simple structure composed of 1 to 3 nephrons, the metanephros is complex and can contain up to one million nephrons in humans. In mammals, most experimental studies have focused on the more complex metanephros. An alternative model to study kidney organogenesis is provided by the frog, *Xenopus laevis*. *Xenopus* embryos develop a fully functional pronephric kidney within three days. Furthermore, *Xenopus* pronephros is readily accessible to gene manipulation and marker gene expression analysis. Hence, I used here the *Xenopus* pronephros as a model to study the functions of Wnt/Fzd signaling during vertebrate kidney organogenesis. The Wnt gene family encodes for secreted glycoproteins, which bind and activate seven-pass transmembrane receptor of the Fzd gene family. Downstream of Fzd three distinct intracellular signaling pathways are activated leading to cell specification, differentiation and/or polarization. Wnt4, Wnt9b, and Wnt11 have been implicated in different steps of mouse kidney organogenesis. Interestingly, both in mouse and in *Xenopus*, Wnt4 function is required for renal tubulogenesis, which demonstrates a conserved role for Wnt4 signaling during vertebrate kidney development. Presently, it is not known, which Fzd genes function during vertebrate kidney development to mediate Wnt4 signaling.

Here, I asked here which fzd genes are implicated during pronephric kidney development in *Xenopus*. By whole-mount *in situ* hybridization, I detected that fzd3, fzd6, and fzd8 were expressed in the developing pronephric kidney. Interestingly, fzd3 was detected, similarly to wnt4, in the developing proximal tubule. fzd6 was expressed late along the entire pronephric nephron. Finally, fzd8 was expressed in the developing intermediate, distal, and connecting tubules of the pronephros. Hence, I focused my studies on analyzing fzd3, fzd6, and fzd8 gene functions and the downstream signaling pathways involved during pronephric kidney organogenesis.

I report here, that fzd3 function was required for specification of proximal tubule cells. In the absence of fzd3, no expression of proximal tubule marker genes could be detected. In addition, when expressed ectopically, fzd3 was able to induce ectopic pronephric tissue that would differentiate to proximal tubules. The fzd3 phenotype was reminiscent of the wnt4 knockdown phenotype. Using cell cultures, I was able to demonstrate that fzd3 can interact with wnt4. Taken together, fzd3 is the likely *in vivo* receptor mediating wnt4 signaling during proximal tubule development. Knockdown studies of fzd6 failed to reveal a renal phenotype. Finally, fzd8 knockdowns disrupted maturation of pronephric epithelia. Moreover, ectopic fzd8 expression suppressed the formation of proximal tubules and promoted intermediate and distal tubule cell fates. Interestingly, activation of the canonical Wnt signaling pathway or inhibition

of the planar cell polarity (PCP) pathway blocked terminal differentiation of intermediate, distal, and connecting tubules. In summary, I demonstrated that *wnt4* signals via *fzd3* to instruct renal precursor cells to acquire proximal tubule fate. In contrast, *fzd8* appears to activate the PCP pathway to initiate terminal differentiation of intermediate, distal, and connecting tubules.

In collaboration with the laboratory of Prof. Kühl, I have also been involved in a study focusing on the role of Wnt4 signaling during eye development. Interestingly, we demonstrated that *wnt4* functioned upstream of *eaf2*, activated the PCP pathway and was required for eye organogenesis. Furthermore, I also showed that *eaf2* acted downstream of *wnt4* during pronephric kidney development. Taken together, *eaf2* functions as a downstream target of *wnt4* in the developing eye and pronephros.

Finally, I have been involved in a collaboration with the laboratory of Prof. Carmeliet, which led to the establishment of *Xenopus* as a model to study vertebrate lymphangiogenesis.

## Résumé

Dans cette thèse, j'ai utilisé le xénope comme animal modèle pour étudier la fonction des familles de gènes Wnt et Frizzled (Fzd) pendant l'organogénèse des reins. Chez les vertébrés, les reins se développent en trois phases correspondant à trois formes distinctes de reins : le pronephros, le mésonéphros et le métanéphros. Alors que le pronephros, est une structure simple composée de 1 à 3 néphrons, le métanéphros est un organe complexe qui peut contenir un million de néphrons chez l'humain. Le métanéphros, bien que complexe, est la principale forme de rein étudiée chez les mammifères. Alternativement, le xénope peut être utilisé comme modèle animal pour l'étude du rein. En effet, les embryons du xénope développent un pronephros totalement fonctionnel en 3 jours. De plus, la manipulation génétique ainsi que l'analyse du développement du pronephros à l'aide de marqueurs moléculaires est assez aisée chez le xénope. En conséquence, j'ai utilisé le pronephros du xénope comme modèle pour étudier le rôle des différents gènes membres de la famille Wnt et Fzd durant la formation des reins. Les gènes de la famille Wnt encodent des gluco-protéines sécrétées. Ces gluco-protéines peuvent interagir à la surface des cellules avec les récepteurs transmembranaires de la famille Fzd. Dans le cytoplasme, trois voies de signalisations distinctes peuvent être activées par les protéines Fzd. Ces signaux engendrent soit la spécialisation, la différenciation et/ou la polarisation cellulaire. Wnt4, Wnt9b et Wnt11 sont nécessaires à l'organogénèse du rein chez la souris. Plus encore, Wnt4 est nécessaire à la fois chez la souris et le xénope au début de la tubulogénèse. Ces résultats suggèrent que le rôle joué par les signaux émanant des protéines Wnt est conservé pendant l'organogénèse du rein chez les vertébrés. Actuellement, il n'est pas établi quel Fzd récepteur est utilisé par Wnt4 pendant la tubulogénèse du rein.

Ici, j'ai donc tenté d'identifier quel gène Fzd peut jouer un rôle pendant le développement du pronephros de xénope. Par hybridation *in situ*, j'ai établi que *fzd3*, *fzd6* et *fzd8* sont exprimés dans le pronephros durant son développement. Notamment, *fzd3* est exprimé dans le tubule proximal d'une façon similaire à *wnt4*. *fzd6* est exprimé tardivement tout au long de l'épithélium du pronephros. Finalement, *fzd8* est exprimé dans les tubules intermédiaires, distaux et connectant pendant l'organogénèse du rein.

Je rapporte ici, que *fzd3* est nécessaire à la spécification des cellules du compartiment tubulaire proximal. En effet, en l'absence de *fzd3*, aucune cellule n'acquiert le caractère proximal. De plus, l'activation ectopique de *fzd3* entraîne le recrutement de cellules non destinées au compartiment proximal à acquérir un caractère proximal. Le phénotype généré par l'absence de *fzd3* est similaire à celui observé par l'absence de *wnt4*. De plus, des résultats obtenus lors de cultures cellulaires suggèrent que *fzd3* est le récepteur de *wnt4* pendant le développement du pronephros. En résumé, *fzd3* est très probablement le récepteur *in vivo* par lequel *wnt4* signale pendant l'organogénèse du rein. L'absence de *fzd6* n'a pas révélé de défauts dans le rein. Finalement, l'inhibition de *fzd8* empêche la maturation de l'épithélium pronephric. De

plus, *fzd8* est capable de convertir des cellules proximales en cellules plus distales. En outre, l'activation de la voie de signalisation canonique ainsi que l'inhibition de la voie de polarisation dans le plan entraînent le même phénotype que l'absence de *fzd8*. En résumé, j'ai démontré que *wnt4* signale au travers de *fzd3* pour spécifier les cellules du pronephros vers le compartiment proximal. Au contraire, *fzd8* active la voie de polarisation dans le plan dans les compartiments plus postérieurs pour contrôler leur maturation.

Lors d'une collaboration avec le laboratoire du professeur Kühl, j'ai participé à l'étude du rôle de *wnt4* pendant l'organogénèse des yeux. Lors de cette étude, nous avons démontré que *wnt4* entraîne l'expression de *eaf2*, l'activation de la polarisation dans le plan et est nécessaire pendant la formation des yeux. De plus, j'ai démontré que *wnt4* entraîne l'expression de *eaf2* dans le rein. En résumé, *eaf2* est un gène cible de *wnt4* lors du développement de l'œil et du rein.

Enfin, lors d'une collaboration avec le laboratoire du professeur Carmeliet, nous avons établi que le xénope est un modèle permettant l'étude de l'angiogenèse du système lymphatique.