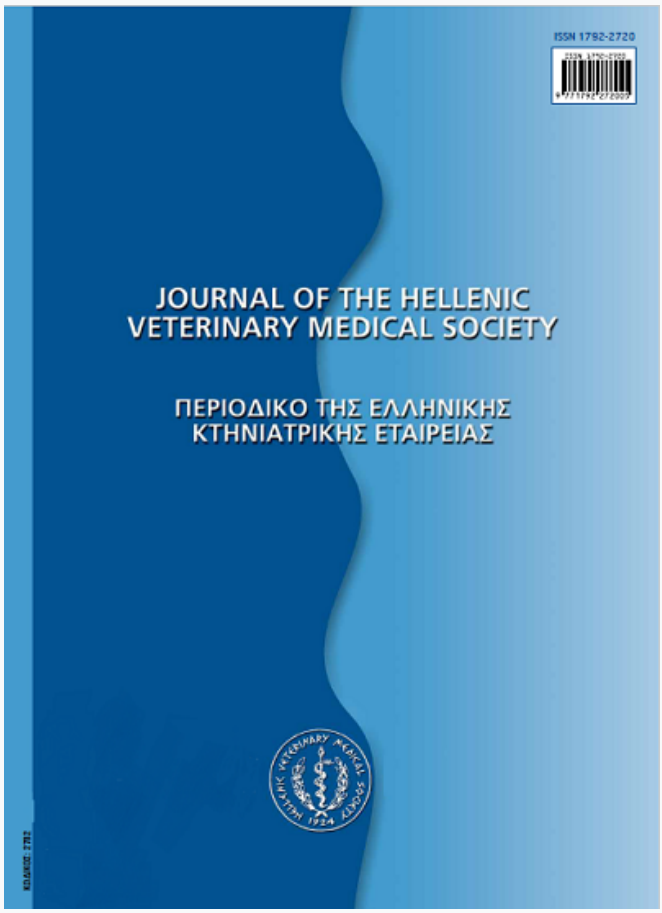
ePublishing

ΕΘΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΤΕΚΜΗΡΙΩΣΗΣ
NATIONAL DOCUMENTATION CENTRE

Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 61, No 3 (2010)



Genetically modified animal models and Osteoimmunology

E. DOUNI (E.NTOYNH)

doi: 10.12681/jhvms.14891

To cite this article:

DOUNI (E.NTOYNH) E. (2017). Genetically modified animal models and Osteoimmunology. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, *61*(3), 236–240. https://doi.org/10.12681/jhvms.14891

https://epublishing.ekt.gr | **e-Publisher:** EKT | **Downloaded at:** 13/08/2025 01:26:51

JOURNAL OF THE HELLENIC VETERINARY MEDICAL SOCIETY 2010, 61(3): 236-240
ΠΕΡΙΟΔΙΚΟ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ 2010, 61(3): 236-240

Special article
Ειδικό άρθρο

Genetically modified animal models and Osteoimmunology

Douni E., PhD

Biomedical Sciences Research Center "Alexander Fleming"

Γενετικά τροποποιημένα ζωικά πρότυπα και Οστεοανοσολογία

Ε. Ντούνη, PhD

Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών «Αλέξανδρος Φλέμιγκ»

ABSTRACT. The completion of the human and mouse genome DNA sequences easily enabled chromosomal localization for each gene, whereas the role of each gene remains largely unknown. Functional Genomics constitutes the new area of Molecular Biology that aims to identify the function(s) of each gene in order to understand the pathogenic mechanisms in various human diseases. The mouse has been extensively used more than any other animal organism in biomedical research, because, except for the similarities it displays with humans, its genome can be genetically modified rather easily. During the last two decades, technological advances enable almost all kinds of mutations in the mouse genome. More specifically, the study of genetically modified mice revealed the continuous interaction between various systems within the organism, such as the interplay between the skeletal and the immune system, introducing the interdisciplinary area of Osteoimmunology. The cytokine RANKL constitutes the key molecule in Osteoimmunology, by regulating osteoclastogenesis, while deregulation of RANKL expression leads to diseases such as osteopetrosis or osteoporosis. In our laboratory we have recently generated, using state-of-the-art technologies, unique mouse models of RANKL-induced osteopetrosis or osteoporosis. These mouse models constitute excellent systems for the study of underlying pathogenic mechanisms and for the evaluation of novel therapeutic approaches at the preclinical level.

Keywords: Functional Genomics, transgenic mice, RANKL, osteoimmunology, osteopetrosis, osteoporosis

ΠΕΡΙΛΗΨΗ. Με την αποκωδικοποίηση του γονιδιώματος του ανθρώπου και άλλων οργανισμών, όπως του μυός, έγινε γνωστή η χρωμοσωμική θέση κάθε γονιδίου, αλλά παραμένει ακόμα άγνωστος ο ρόλος των περισσότερων γονιδίων. Η Λειτουργική Γονιδιωματική (Functional Genomics) αποτελεί τον νέο κλάδο της Μοριακής Βιολογίας που αποσκοπεί στην εύρεση της/των λειτουργίας/ιών κάθε γονιδίου με σκοπό την κατανόηση των παθογενετικών μηχανισμών στις διάφορες ασθένειες του ανθρώπου. Ο μυς έχει χρησιμοποιηθεί περισσότερο από κάθε άλλο ζωικό οργανισμό στη βιοϊατρική έρευνα, γιατί εκτός των υπόλοιπων ομοιοτήτων με τον άνθρωπο, το γονιδίωμά του μπορεί να τροποποιηθεί γενετικά σχετικά εύκολα. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δύο δεκαετιών, έγινε δυνατή η δημιουργία σχεδόν κάθε είδους μετάλλαξης στο γονιδίωμά του. Ειδικότερα, η μελέτη των γενετικά τροποποιημένων μυών ανέδειξε την συνεχή αλληλεπίδραση μεταξύ διαφόρων συστημάτων, όπως του σκελετικού με το ανοσοποιητικό, εισάγοντας τον διεπιστημονικό τομέα της Οστεοανοσολογίας. Η κυτταροκίνη RANKL αποτελεί το μόριο κλειδί στην Οστεοανοσολογία, ρυθμίζοντας την οστεοκλαστογένεση, ενώ απορρύθμιση της έκφρασης του RANKL οδηγεί σε ασθένειες όπως είναι η οστεοπέτρωση ή οστεοπόρωση. Στο εργαστήριό μας έχουμε πρόσφατα δημιουργήσει, χρησιμοποιώντας τεχνολογίες αιχμής, μοναδικά διεθνώς μοντέλα RANKL-επαγόμενης οστεοπέτρωσης ή οστεοπόρωσης στο μυ. Τα μοντέλα αυτά αποτελούν άριστα συστήματα για τη μελέτη των παθογενετικών μηχανισμών και για την αξιολόγηση νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων σε προκλινικό επίπεδο.

Λέξεις ευρετηρίασης: Λειτουργική Γονιδιωματική, διαγονιδιακοί μύες, RANKL, οστεοανοσολογία, οστεοπέτρωση, οστεοπόρωση

Correspondence: Douni E.
Biomedical Sciences Research Center "Alexander Fleming"
34 Al. Fleming str., 166 72 Vari, Tel.: 210 9656310 (ext. 164), E-mail: douni@fleming.gr

Αλληλογραφία: Ε. Ντούνη
Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών «Αλέξανδρος Φλέμιγκ»
Αλ. Φλέμιγκ 34, 166 72 Βάρη, Τηλ.: 210 9656310 (εσωτ. 164), E-mail: douni @fleming.gr

Submission date: 05.11.2009
Approval date: 04.02.2010

Ημερομηνία υποβολής: 05.11.2009
Ημερομηνία εγκρίσεως: 04.02.2010

Εισαγωγή

Στη μεταγονιδιωματική εποχή, που άρχισε με την αποκωδικοποίηση του γονιδιώματος διαφόρων οργανισμών, κρίνεται απαραίτητη η ανάπτυξη αποτελεσματικών μεθόδων για την εύρεση της/των λειτουργίας/ιών κάθε γονιδίου. Μέχρι σήμερα υπολογίζεται ότι τα θηλαστικά έχουν περίπου 25.000 γονίδια και το ενδιαφέρον πλέον στον τομέα της βιοϊατρικής έρευνας επικεντρώνεται στην κατανόηση των λειτουργιών μιας πρωτεΐνης όχι μόνο σε μοριακό και κυτταρικό επίπεδο, αλλά και στο επίπεδο ενός οργανισμού, με σκοπό τη βελτιστοποίηση των θεραπειών πολλών ασθενειών του ανθρώπου.

Ο εργαστηριακός μυς θεωρείται ευρέως ο πρότυπος οργανισμός για τη μελέτη ασθενειών του ανθρώπου, μιας και το 99% των γονιδίων μεταξύ μυός και ανθρώπου είναι ομόλογα. Ο μυς ως θηλαστικό έχει μεγάλο βαθμό ομοιότητας με τον άνθρωπο στην ανατομία, τη φυσιολογία και τη γενετική, ενώ έχει σύντομο κύκλο ζωής και μεγάλο αριθμό απογόνων (Rosenthal et al. 2007). Η ολοκλήρωση της αποκωδικοποίησης του γονιδίωματος του μυός (Mouse Genome Sequencing Consortium, 2002), σε συνδυασμό με την ελεύθερη πρόσβαση σε διάφορες τράπεζες βιοπληροφορικής, δίνουν τη δυνατότητα άντλησης αξιόπιστων δεδομένων για τη δομή των γονιδίων και τις πιθανές ισομορφές των παραγόμενων πρωτεϊνών. Η γνώση αυτή είναι απαραίτητη για τον σχεδιασμό κατάλληλων γονιδιακών κατασκευών με σκοπό τη δημιουργία γενετικά τροποποιημένων οργανισμών. Επιπλέον, στο γονιδίωμα του μυός είναι δυνατό να επιτευχθούν όλων των ειδών οι γενετικές τροποποιήσεις χρησιμοποιώντας τεχνολογίες αιχμής. Το γεγονός αυτό επιτρέπει τη δημιουργία νέων ζωικών προτύπων, που αποτελούν μοναδικά εργαλεία τόσο για την κατανόηση των παθογενετικών μηχανισμών στην ασθένεια, όσο και για την αξιολόγηση νέων θεραπευτικών στόχων και προσεγγίσεων (Rosenthal et al. 2007).

Τα γενετικά τροποποιημένα στελέχη μυών αποτελούν ένα ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο στον τομέα της Λειτουργικής Γονιδιωματικής, το νέο κλάδο της Μοριακής Βιολογίας που έρχεται να αναδείξει τη λειτουργία (ες) κάθε γονιδίου. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δύο δεκαετιών, έγινε δυνατή η δημιουργία σχεδόν κάθε είδους μετάλλαξης στο γονιδίωμα του μυός με τη βοήθεια δύο προσεγγίσεων, της «αντίστροφης γενετικής» (reverse genetics) και της «πρόσθιας γενετικής» (forward genetics). Όλες οι τεχνολογίες αιχμής που περιγράφονται στη συνέχεια, εφαρμόζονται με επιτυχία στο Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών «Αλέξανδρος Φλέμιγκ» (www.fleming.gr).

ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ: Από το γονίδιο στο φαινότυπο

Στην «αντίστροφη γενετική», ο ερευνητής έχοντας απομονώσει το γονίδιο που μελετά, μπορεί να το τροποποιήσει σε επίπεδο οργανισμού και να μελετήσει το αποτέλεσμα της γενετικής επέμβασης με την παρατήρηση ενός φαινοτύπου. Η προσέγγιση αυτή επιτρέπει την εισαγωγή νέων γονιδίων σε ολόκληρους οργανισμούς (διαγονιδιακοί μύες –transgenic mice), την κατευθυνόμενη απενεργοποίηση ενδογενών γονιδίων σε όλα (knockout mice) ή σε επιλεγμένα κύτταρα του οργανισμού (conditional mutants) και προσφέρει ένα in vivo σύστημα για την αναγνώριση γονιδίων που καθορίζουν την ομαλή λειτουργία του οργανισμού ή που ευθύνονται για ασθένειές του (Douni et al. 2004).

Οι **διαγονιδιακοί οργανισμοί** προκύπτουν με την τυχαία ενσωμάτωση ενός εξωγενούς γονιδίου στο γονιδίωμά τους και συνήθως υπερεκφράζουν μια πρωτεΐνη οπότε αποτελούν ιδανικά συστήματα μελέτης διαδικασιών και λειτουργιών που πιθανόν απορρυθμίζονται και οδηγούν στην ασθένεια. Με τον τρόπο αυτό μπορούν να μελετηθούν και να κατανοηθούν οι μοριακοί και κυτταρικοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στην παθογένεση των ασθενειών αυτών, ενώ τα διαγονιδιακά μοντέλα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για δοκιμές φαρμακευτικών ουσιών σε προκλινικό επίπεδο. Για παράδειγμα, διάφορες διαγονιδιακές σειρές μυών που υπερεκφράζουν τον Παράγοντα Νέκρωσης Όγκων (TNF, Tumor Necrosis Factor) και τους υποδοχείς του σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους εμφανίζουν παθολογίες που προσομοιάζουν φλεγμονώδεις ασθένειες του ανθρώπου, όπως τη Ρευματοειδή Αρθρίτιδα, τη Σκλήρυνση κατά πλάκας και τη γενικευμένη φλεγμονή (Douni et al. 2007).

Η τεχνολογία της **κατευθυνόμενης γονιδιακής στόχευσης** (gene targeting) έχει εφαρμοστεί με μεγάλη επιτυχία τις τελευταίες δύο δεκαετίες στο μυ και επιτρέπει την αντικατάσταση ενός ενδογενούς γονιδίου από ένα εξωγενές που φέρει την επιθυμητή μετάλλαξη και επιτυγχάνεται με ομόλογο ανασυνδυασμό σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (Embryonic stem cells, ES). Ο ομόλογος ανασυνδυασμός σε ES κύτταρα επιτρέπει είτε τη διακοπή της έκφρασης ενός γονιδίου

(**knockout**) είτε την εισαγωγή μεταλλάξεων σε ένα γονίδιο με μεγάλη ακρίβεια (**knockin**) σε όλα τα κύτταρα ενός οργανισμού (Prosser et al. 2003). Η μελέτη των οργανισμών αυτών απαντά στο εάν η αντίστοιχη πρωτεΐνη παίζει ρόλο στην ανάπτυξη του οργανισμού και στη φυσιολογία ή εάν υπάρχουν άλλες πρωτεΐνες που αναπληρώνουν την έλλειψή της. Υπολογίζεται ότι ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων είναι απαραίτητος κατά την ανάπτυξη, οπότε στις περιπτώσεις αυτές η αδρανοποίησή τους σε knockout μύες οδηγεί σε θνησιγόνο φαινότυπο κατά την εμβρυϊκή περίοδο.

Στο μυ είναι δυνατόν πλέον να επιτύχουμε ενεργοποίηση ή αδρανοποίηση της μεταγραφής ενός γονιδίου σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους, ακόμα και τη χρονική στιγμή που επιθυμούμε. Οι **«υπό όρους» γονιδιακές τροποποιήσεις** (conditional gene targeting) μπορούν να οριστούν ως οι γονιδιακές τροποποιήσεις, οι οποίες συμβαίνουν μόνο σε ορισμένους κυτταρικούς τύπους (κυτταροειδικές) ή επάγονται σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια ενός οργανισμού (χρονοεπαγόμενες) (Douni et al. 2004; Branda et al. 2004). Αντιθέτως, η αδρανοποίηση γονιδίων στους knockout οργανισμούς γίνεται σε όλα τα κύτταρα του οργανισμού. Η τεχνολογία αυτή είναι ιδιαίτερα χρήσιμη σε περιπτώσεις που: α) οι αντίστοιχοι knockout μύες δεν επιβιώνουν και β) ένα γονίδιο εκφράζεται σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια και/ή σε διάφορους κυτταρικούς τύπους. Η προσέγγιση αυτή συνδυάζει την τεχνολογία της γονιδιακής στόχευσης με συστήματα τοποειδικού ανασυνδυασμού, όπως αυτό του συστήματος Cre/loxP, και αποσκοπεί συνήθως στην υπό όρους ενεργοποίηση, απενεργοποίηση ή αντικατάσταση ενός γονιδίου (Douni et al. 2004).

ΠΡΟΣΘΙΑ ΓΕΝΕΤΙΚΗ: Από το φαινότυπο στην εύρεση του γονιδίου

Η πρόσθια γενετική ακολουθεί την τακτική της κλασικής γενετικής, παρατηρώντας δηλαδή ένα φαινότυπο ακολουθεί η εύρεση του μεταλλαγμένου γονιδίου χρησιμοποιώντας ειδικές διασταυρώσεις και γενετική ανάλυση. Μιας και οι αυθόρμητες μεταλλάξεις είναι σπάνιες στη φύση, λόγω της ευεργετικής δράσης των επιδιορθωτικών ενζύμων, οι ερευνητές επάγουν τη δημιουργία τυχαίων μεταλλάξεων και συνεπώς νέων φαινοτύπων με τη χρήση χημικών μεταλλαξογόνων, όπως η αιθυλνιτροζουρία που προκαλεί τυχαίες σημειακές μεταλλάξεις. Οι μύες που έχουν υποστεί μεταλλαξογένεση διασταυρώνονται με μύες φυσικού τύπου με σκοπό τη φαινοτυπική ανάλυση των απογόνων για τον εντοπισμό επικρατούντων ή υπολειπόμενων μεταλλάξεων. Ανάλογα με τη φαινοτυπική ανάλυση που εφαρμόζεται στους απογόνους είναι δυνατόν να εντοπιστούν ποικίλα νέα ζωικά πρότυπα ασθενειών του ανθρώπου. Με κατάλληλες διασταυρώσεις και χρήση πολυμορφικών γενετικών δεικτών επιτυγχάνεται αρχικά ο εντοπισμός του μεταλλαγμένου γονιδίου σε μία συγκεκριμένη χρωμοσωμική περιοχή και στη συνέχεια η υπεύθυνη μετάλλαξη αποκαλύπτεται με ανάγνωση της αλληλουχίας του DNA. Η προσέγγιση αυτή επιτρέπει τον εντοπισμό γονιδίων που ευθύνονται για την πρόκληση μιας ασθένειας και συνεπώς αποσκοπεί στην εύρεση νέων θεραπευτικών στόχων (Nelms et al. 2001).

Το μεγάλο πλεονέκτημα της επαγωγής σημειακών μεταλλάξεων με αιθυλνιτροζουρία αποτελεί η δημιουργία μιας σειράς αλληλομόρφων για κάθε γονίδιο που μπορεί να οδηγεί σε: i) αδρανοποίηση της λειτουργίας, ii) δημιουργία νέας λειτουργίας, iii) υπομορφικό αλληλόμορφο (μείωση της λειτουργίας), iv) αντιμορφικό αλληλόμορφο (ανταγωνίζεται τη λειτουργία της φυσιολογικής πρωτεΐνης) και v) υπερμορφικό αλληλόμορφο (αυξημένη δραστικότητα, π.χ. αυξημένη πρόσδεση) (Nelms et al. 2001; Cook et al. 2006). Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται από τη μια η μελέτη των πολλαπλών λειτουργιών μιας πρωτεΐνης και από την άλλη η δημιουργία αλληλομόρφων που προσομοιάζουν αυτούς που προκαλούνται τυχαία στη φύση.

ΟΣΤΕΟΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΖΩΙΚΑ ΠΡΟΤΥΠΑ

Η Οστεοανοσολογία αποτελεί ένα νέο διεπιστημονικό κλάδο έρευνας που επικεντρώνεται στην αλληλεπίδραση του σκελετικού με το ανοσολογικό σύστημα (Walsh et al. 2006) και στοχεύει στην κατανόηση των μηχανισμών που ελέγχουν τα δύο συστήματα για την ανακάλυψη καινοτόμων θεραπειών για ασθένειες που σχετίζονται και με τα δύο, όπως είναι η ρευματοειδής αρθρίτιδα και η οστεοπόρωση. Έρευνες σε γενετικά τροποποιημένα ζωικά πρότυπα ανέδειξαν την ύπαρξη ρυθμιστικών μορίων, όπως κυτταροκίνες, υποδοχείς, μόρια σηματοδότησης και μεταγραφικοί παράγοντες, που ελέγχουν τόσο το σκελετικό όσο και το ανοσολογικό σύστημα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η εύρεση του ρόλου της κυτταροκίνης RANKL (receptor activator of nuclear factor kappaB ligand) στην Οστεοανοσολογία με τη χρήση γενετικά τροποποιημένων ποντικών. Ο RANKL ανήκει στην TNF υπεροικογένεια (Anderson et al. 1997) και αποτελεί τον κύριο μεσολαβητή στη δημιουργία, δραστη-

ριότητα και επιβίωση των οστεοκλαστών (Lacey et al. 1998) και επομένως της οστικής απορρόφησης (Fuller at al. 1998). Ως τριμερές συνδέεται στον RANK υποδοχέα, επάγοντας τα ενδοκυτταρικά μονοπάτια που οδηγούν στην οστεοκλαστογένεση, ενώ η δράση του αναστέλλεται από την οστεοπροτεγερίνη (OPG).

RANKL-επαγόμενη οστεοπέτρωση

Μελέτες σε knockout μύες έδειξαν ότι η έλλειψη του RANKL από τον οργανισμό προκαλεί οστεοπέτρωση, δηλαδή παθολογική αύξηση της οστικής μάζας λόγω απουσίας των οστεοκλαστών, των κυττάρων που επάγουν οστική αποικοδόμηση (Kong et al. 1999). Οι RANKL knockout μύες εμφανίζουν επίσης διαταραχές στο ανοσοποιητικό σύστημα, όπως μη φυσιολογικούς πληθυσμούς Τ και Β λεμφοκυττάρων και παντελή έλλειψη λεμφαδένων. Πρόσφατα στο εργαστήριό μας δημιουργήσαμε με τυχαία μεταλλαξογένεση ένα νέο πρότυπο οστεοπέτρωσης, που οφείλεται σε μία σημειακή μετάλλαξη στο γονίδιο του RANKL (Douni et al. 2008). Η παραγόμενη RANKL πρωτεΐνη είναι ανενεργή λόγω αλλαγής ενός αμινοξέος στην εξωκυτταρική περιοχή της. Παρόμοιες μεταλλάξεις στο γονίδιο του RANKL εντοπίστηκαν πρόσφατα σε ασθενείς με οστεοπέτρωση για τους οποίους προς το παρόν δεν υπάρχει θεραπεία (Sobacchi et al. 2007). Η μελέτη των γενετικά τροποποιημένων μυών, που παράγουν την ανενεργή μορφή της RANKL πρωτεΐνης, πρόκειται να βοηθήσει τόσο στην κατανόηση των μοριακών και κυτταρικών μηχανισμών που δημιουργούν οστεοπέτρωση, όσο και στην εφαρμογή ερευνητικών πρωτοκόλλων για τη θεραπεία της νόσου.

RANKL-επαγόμενη οστεοπόρωση

Αυξημένη παραγωγή του RANKL συνδέεται με αυξημένη οστεοκλαστογένεση και οστική απώλεια σε ασθένειες όπως οστεοπόρωση, ρευματοειδής αρθρίτιδα, οστικές μεταστάσεις. Οι μέχρι τώρα κλινικές δοκιμές δείχνουν ότι το Denosumab, ένα αντί-RANKL μονοκλωνικό αντίσωμα, αναστέλλει αποτελεσματικά την οστική απώλεια και τα κατάγματα σε οστεοπορωτικούς ασθενείς (Cummings et al. 2009), υπερέχοντας της τωρινής αντι-οστεοπορωτικής αγωγής (διφωσφωνικά), και αναμένεται να κυκλοφορήσει ως φάρμακο για την οστεοπόρωση μέσα στο 2010. Ωστόσο, δεν υπάρχει με τα μέχρι στιγμής δεδομένα ένα μοντέλο υπερέκφρασης του RANKL του ανθρώπου.

Χρησιμοποιώντας τεχνολογίες αιχμής, δημιουργήσαμε πρόσφατα στο εργαστήριό μας διαγονιδιακούς μύες που υπερεκφράζουν το RANKL γονίδιο του ανθρώπου ώστε να μελετήσουμε τις επαγόμενες παθολογίες (Niti et al. 2009). Η ιστολογική ανάλυση δείχνει ότι η υπερέκφραση του RANKL σε διαγονιδιακούς μύες επάγει σοβαρή οστική απορρόφηση με εκτεταμένη απώλεια του σπογγώδους οστού, κατάγματα, καταστροφή του χόνδρου και αλλαγή της δομής του φλοιώδους οστού από συμπαγές σε πορώδες και έντονη οστεοκλαστογένεση. Οι διαγονιδιακοί αυτοί μύες αποτελούν ιδανικά εργαλεία για τη μελέτη των μηχανισμών που εμπλέκονται στην οστική απορρόφηση, καθώς και τις προκλινικές δοκιμές νέων φαρμακευτικών ουσιών που στοχεύουν ασθένειες με οστική απώλεια, όπως είναι η οστεοπόρωση.

REFERENCES - ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, DuBose RF, Cosman D, Galibert L (1997) A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. Nature, 390(6656):175-9.

Branda CS, Dymecki SM (2004) Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice. Dev Cell, 6(1):7-28.

Cook MC, Vinuesa CG, Goodnow CC (2006) ENU-mutagenesis: insight into immune function and pathology. Curr Opin Immunol, 18(5):627-33.

Cummings SR, San Martin J, McClung MR, Siris ES, Eastell R, Reid IR, Delmas P, Zoog HB, Austin M, Wang A, Kutilek S, Adami S, Zanchetta J, Libanati C, Siddhanti S, Christiansen C; FREEDOM Trial (2009) Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. N Engl J Med, 361(8):756-65.

Douni E, Alexiou M, Kontoyiannis D, Kollias G (2004) Genetic engineering in the mouse: Tuning TNF/TNFR expression. In: Methods in Molecular Medicine, Vol. 98: Tumor Necrosis Factor. Eds A. Corti and P. Ghezzi. Humana Press Inc., p139-171.

Douni E, Armaka M, Kontoyiannis DL, Kollias G (2007) Functional genetic and genomic analysis of modeled arthritis. Adv Exp Med Biol, 602:33-42.

Douni E, Makrinou E and Kollias G (2008) Identification of a novel loss-of-function missense mutation in the RANKL gene that causes osteopetrosis in mice. Calcified Tissue International, vol. 82, suppl.1:S57.

Fuller K, Wong B, Fox S, Choi Y, Chambers, TJ (1998) TRANCE is necessary and sufficient for osteoclast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. J Exp Med, 188(5): 997-1001.

Kong, YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveira-dos-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, Penninger JM (1999) OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte

development and lymph-node organogenesis. Nature, 397(6717): 315-323.

Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ (1998) Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. Cell, 93(2):165-76.

Mouse Genome Sequencing Consortium. (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. Nature, 420:520-562.

Nelms KA, Goodnow CC (2001) Genome-wide ENU mutagenesis to reveal immune regulators. Immunity, 15(3):409-18.

Niti A, Rinotas V, Douni E (2009) A novel humanized RANKL transgenic mouse model of osteoporosis., Bone, vol 44: S423.

Prosser H, Rastan S (2003). Manipulation of the mouse genome: a multiple impact resource for drug discovery and development. Trends Biotechnol, 21(5):224-32.

Rosenthal N, Brown S (2007) The mouse ascending: perspectives for human-disease models. Nat Cell Biol, 9(9):993-9.

Sobacchi C, Frattini A, Guerrini MM, Abinun M, Pangrazio A, Susani L, Bredius R, Mancini G, Cant A, Bishop N, Grabowski P, Del Fattore A, Messina C, Errigo G, Coxon FP, Scott DI, Teti A, Rogers MJ, Vezzoni P, Villa A, Helfrich MH (2007) Osteoclast-poor human osteopetrosis due to mutations in the gene encoding RANKL. Nat Genet, 39(8):960-2.

Walsh M, Kim N, Kadono Y, Rho J, Young Lee S, Lorenzo J, Choi Y (2006) Osteoimmunology: Interplay between the immune system and bone metabolism, Annual Review of Immunology, 24:33-63.