

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY

Genetické a etiopatogenetické aspekty syndromu neklidných nohou

AUTOREFERÁT DISERTAČNÍ PRÁCE

MUDr. David Kemlink

Praha

2006



Disertační práce byla vypracována na Neurologické klinice 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze v rámci postgraduálního doktorského studia biomedicíny, studijní program Neurovědy

Předkladatel: MUDr. David Kemlink

Školitel: prof. MUDr. Soňa Nevšimalová, DrSc.
Neurologická klinika 1. LF UK a VFN
Kateřinská 30
120 00 Praha 2

Oponenti:

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba disertační práce se koná dne:

Souhrn

Syndrom neklidných nohou (RLS) je senzomotorické onemocnění charakterizované nucením k pohybu dolními končetinami, které bývá často spojeno s nepříjemnými vjemy. Obtíže jsou zmírňovány pohybem, a naopak se zhoršují v klidu, zejména na lůžku a zabraňují klidnému spánku. Tyto příznaky vykazují cirkadiánní rytmicitu s maximem ve večerních hodinách a první polovině noci. Diagnóza je stanovována na základě anamnestických údajů splňujících definovaná kritéria.

V evropských zemích vykazuje RLS vysokou prevalenci, okolo 10 procent, a je až dvakrát častější u žen. Onemocnění se vyskytuje ve formě sekundární a idiopatické. U idiopatické formy je přibližně v polovině případů popisována pozitivní rodinná anamnéza. V literatuře byly dosud popsány tři lokusy ve vazbě s předpokládanými genetickými determinantami pro RLS na chromozomech 12, 14 a 9 (*RLS1*, *RLS2* a *RLS3*). Další dva lokusy na chromozomech 4 a 17 byly objeveny v dosud nepublikované studii. Recentní práce se přiklání ke komplexnímu genetickému podmínění RLS. Cílem studie bylo porovnat klinické a laboratorní parametry mezi familiárními a sporadickými formami. V rodinách, kde se RLS vyskytuje, bylo záměrem ověřit již popsané lokusy, eventuálně vyhledat další. U pacientů trpících RLS byly kromě klinického vyšetření stanoveny hematologické a biochemické ukazatele včetně hladin erythropoetinu a solubilního transferinového receptoru. DNA byla odebrána v rodinách našich pacientů, kde se RLS vyskytoval u více než dvou pacientů, a shromažďována v rámci evropské multicentrické studie EU-RLS-GENE. U rodin českého původu byly otestovány v dosud popsaných lokusech pomocí parametrických a neparametrických vazebných testů. U dalších čtyř rodin z projektu EU-RLS-GENE byly provedeny vazebné analýzy v rámci celého genomu. Dále byla provedena asociační studie založená na nukleárních rodinách (tria) s oblastmi vykazujícími vazbu v předešlých experimentech pomocí testu nerovnováhy přenosu alel (TDT), který rovněž slouží i jako neparametrický test pro genetickou vazbu. Tria byla rozdělena do tří skupin podle jejich etnického původu. Genotypizace byla prováděna pomocí mikrosatelitních markerů, genomová vyšetření pomocí jednonukleotidových markerů (SNP).

U 228 klinicky vyšetřených pacientů byl prokázán signifikantně nižší věk při nástupu obtíží u familiárního RLS jako jediný rozdíl oproti sporadickému. U 183 laboratorně vyšetřených pacientů byl pouze zachycen mírně nižší počet erytrocytů u sporadických forem na sugestivní hranici signifikance. Familiární formy měly medián hladiny erythropoetinu významně snížený oproti referenční populaci. Tento nálezní potvrzuje předchozí pozorování a představuje první náznak abnormality metabolismu erythropoetinu u familiárního RLS. V 10 rodinách českého původu nebyla potvrzena ani parametrická, ani neparametrická vazba ve studovaných oblastech. Pomocí TDT zde byla prokázána asociace na hladině $p < 0,05$ s markerem D12S78, který je součástí *RLS1*. Výsledek rovněž přispívá k potvrzení vlivu tohoto lokusu ve střeoevropské populaci. Vyšetření genomu odhalilo další potenciální lokus na chromozomu 19 u rodiny italského původu pomocí jak neparametrické, tak i parametrické vazby. Vyšetření 159 trií TDT prokázalo u všech rodin signifikantní vazbu na chromozomu

14 v rozsahu lokusu *RLS2*, a dále potvrdila účast nově objevených oblastí na chromozomech 17 a 19 na genetické determinaci RLS. Na chromozomu 9 v *RLS3* byla nalezena signifikantní vazba pouze v podskupině tří středoevropského a jihoevropského původu, a to v rozdílných částech vyšetřované oblasti. Toto pozorování svědčí pro heterogenitu i v rámci jednoho lokusu. Na chromozomu 4 byla nalezena signifikantní vazba pouze s jedním markerem na okraji vyšetřované oblasti v podskupině severoevropských tří. Tento lokus rovněž nebyl potvrzen v žádném jiném prováděném testu.

Summary

The restless legs syndrome (RLS) is a sensorimotor disorder characterized by urge to move lower extremities and this urge is usually associated with unpleasant sensations. The symptoms of RLS are alleviated with movement and, on the contrary, worsen during rest. The urge presents circadian rhythmicity peaking in the evening and the first half of night. The diagnosis of RLS is set according to patients' history fulfilling the essential criteria. The prevalence of RLS is quite high in western countries about 11%, women being affected twice as often as men. The disease has two forms, secondary and idiopathic. In the idiopathic RLS, positive family history is observed at about 50% of cases. There are already 3 genetic susceptibility loci on chromosomes 12, 14 and 9 published to be linked with RLS (*RLS1*, *RLS2* a *RLS3*). Further 2 new loci were identified on chromosomes 17 and 4 insofar unpublished study. The current opinion suggests a complex model of inheritance in RLS. The aim of this project was to compare clinical and laboratory parameters in sporadic to familiar RLS and in families affected by RLS to confirm linkage previously detected loci, and eventually discover new susceptibility loci.

The RLS patients were apart clinical evaluation examined with a set of hematological and biochemical tests, including erythropoietin serum levels and levels of soluble transferrin receptor. DNA was collected in families with 2 and more members affected and centralized within the scope of multicentric European project called EU-RLS-GENE. The families of Czech origin were tested for linkage in known loci using both parametric and non-parametric tests. In other four families out of the EU-RLS-GENE a genome-wide scan was performed. Further we have conducted a family-based association study in trios (a family with one affected offspring and both parents genotyped) from the EU-RLS-GENE sample in the loci, where originally linkage was observed. The trios were divided into three groups according to their ethnical origin. Transmission disequilibrium test (TDT) detecting both association and non-parametric linkage was employed to analyze the trios. Individuals were genotyped using microsatellite markers and the genome wide scan was performed using single nucleotide polymorphisms (SNP).

In 228 clinically examined patients we have proven a significantly lower age-at-onset of RLS in familiar cases as an only difference from the sporadic ones. In 183 patient with laboratory test available we have observed only marginally significant lower absolute count of red blood cells in sporadic as compared to familial RLS. The median of erythropoietin level was significantly lower in patients with familial RLS than in the reference population. This

finding represents the first observation of erythropoetin level in familial RLS. In 10 RLS pedigrees of Czech origin, signs of linkage at tested loci were observed neither by parametric nor non-parametric tests. However, TDT has detected a significant association with marker D12S78 with in *RLS1* locus at $p < 0,05$. This result further corroborates the impact of this locus upon RLS ethiology in the central European population. The genome-wide scan has revealed further locus on chromosome 19 in an Italian family by means of both non-parametric and parametric linkage. A family-based association study has confirmed significant impact in the *RLS2* locus in the whole group and the same significance level was present for loci on chromosomes 17 and 19 confirming their relevance in RLS etiology. For *RLS3* a significant association was observed only in trios of central European origin and for different markers in south european trios. This result suggests a genetic heterogeneity even in the same locus. On chromosome 4 an asociation was observed with only one marginal marker in subset of trios of north European origin. The impact of this locus could not be confirmed.

Úvod

Syndrom neklidných nohou (Restless Legs Syndrome - RLS) je charakterizován nucením pohybovat končetinami (převážně dolními). Tento příznak se objevuje v klidu a je významnější večer a v noci. Ve své rozvinuté formě symptomy onemocnění výrazně ovlivňují život pacientů, zvláště vzhledem k cirkadiánnímu rozložení projevů často způsobují poruchu spánku a v těžších případech až i denní ospalost (Allen 2005). Proto často první stížností pacientů je dlouhá latence usnutí nebo opakované probouzení s následnými opětovnými obtížemi s navozením spánku. I přesto, že onemocnění je již dlouho známé, bývá v klinické praxi často nedostatečně diagnostikováno (Hening, 2004). RLS je všeobecně považováno za extrapyramidové onemocnění, proto je dle MKN 10 zařazováno pod kód G25.8 („Jiná extrapyramidová onemocnění“). V Mezinárodní klasifikaci poruch spánku 2 (International Classification of Sleep Disorders – ICSD2) je RLS zařazen do skupiny „sleep related movement disorders“, tedy poruchy hybnosti spojené se spánkem, zvláště vzhledem k výše uvedené typické poruše spánku, kterou RLS způsobuje.

Syndrom poprvé popsal Willis již v 17. století (Willis T, 1685) a podrobně jej definoval až Ekbohm v letech 1944–1945 (Ekbohm, 1945). V roce 1995 publikovala mezinárodní skupina pro studium RLS hlavní a vedlejší kritéria stanovení diagnózy této choroby (Walters, 1995). Teprve od této doby je možné diagnózu považovat za celosvětově jednotnou a srovnávat studie prováděné různými autory. V roce 2003 byla minimální diagnostická kritéria mezinárodní skupinou pro výzkum RLS (IRLSSG) revidována a rozšířena o použitelnost pro děti mladší dvanácti let a pacienty s poruchou kognitivních funkcí (Allen et al., 2003). Typickým projevem je postižení dolních končetin, ale RLS byl popsán i postihující horní končetiny (Michaud et al., 2000). Velmi těžce postižení pacienti udávají nepříjemné pocity na celém těle.

Mezi časté charakteristiky RLS, které podporují diagnózu, avšak nemusí být vždy vyjádřeny, patří periodické pohyby končetinami, pozitivní terapeutická odpověď na dopaminergní preparáty a pozitivní rodinná anamnéza stran RLS. Nástup obtíží je možný v kterémkoli věku, jedná se o chronické onemocnění, které však může mít dlouhá období s minimální intenzitou projevů a bývají přítomny výrazné rodily v síle obtíží mezi jednotlivými dny. Přesto obtíže většiny pacientů mají tendenci zhoršovat se s věkem (Walters et al., 1996). Intenzita obtíží je hodnocena subjektivně pomocí škály (Allen 2003)

Periodické pohyby končetinami (Periodic Limb Movements – PLM) mají mimovolní charakter, většinou postihují dolní končetiny a vyskytují se převážně ve spánku. Ve významném množství se vyskytují společně s RLS ve více než 80 procentech případů (Montplaisir et al., 1997). V těžších případech se však mohou vyskytovat i za bdělosti a postihovat horní končetiny (Chabli et al., 2000). Periodické pohyby ve spánku (PLMS) se vyskytují v kterémkoli spánkovém stadiu a jsou definovány pohyby od extenze palce až po trojflexi (Coleman et al., 1982). Trvání pohybu se musí pohybovat mezi 0,5 až 5 sekundami, interval mezi jednotlivými pohyby je 4 až 90 sekund. Pro hodnocení musí být přítomny minimálně čtyři pohyby za sebou splňující výše uvedená kritéria. Kvantifikovány jsou počtem jednotlivých pohybů v rámci sekvencí za jednu hodinu spánku (PLM index –

PLMI). Za významné množství je považováno více než pět pohybů za hodinu (PLMI >5). Častý je výskyt PLMS i v rámci dalších onemocnění (Montplaisir et al., 2000), zvláště při narkolepsii, při poruše chování v REM spánku a syndromu spánkové apnoe. Zhoršování příznaků RLS ve večerních a nočních hodinách je způsobeno pravděpodobně nezávislým mechanismem. Rytmicita byla patrná i u pacientů, kteří podstoupili spánkovou deprivaci, která sama o sobě zvyšuje nepříjemné pocity. Vzorec denního průběhu závažnosti příznaků RLS se zdá být svázán s průběhem změn tělesné teploty – maximum obtíží je při poklesu teploty a krátce po vzestupu hladiny melatoninu, naopak při vzestupu teploty a poklesu hladiny melatoninu subjektivních obtíží ubývá (Michaud 2004). Vlastní projevy cirkadiálního rytmu u pacientů s RLS však nejsou změněny, nejsou přítomny abnormality v profilech melatoninu a cortisolu (Wetter et al 2002). Cirkadiální rytmicita byla prokázána u plasmatických hladin dopaminu a jeho metabolitů jak u lidí, tak i v likvoru nižších primátů a v potkaních striatu s maximem v ranních hodinách a minimem v noci, což je nejvíce patrné v oblasti hypotalamu.

Z hlediska etiologie má toto onemocnění dvě formy: idiopatickou a sekundární. Přesvědčivě dokumentovaný výskyt sekundárního RLS je v souvislosti se sideropenií, v těhotenství a u chronického renálního selhání (Allen a Early, 2001). Diabetes mellitus a neuropatie byly rovněž považovány za příčinu sekundárního RLS, jedna studie prokázala vyšší relativní riziko výskytu RLS u diabetiků (Phillips et al., 2000). Souvislost RLS s EMG známkami neuropatie nebyla ve studiích s větším počtem pacientů prokázána (Hogl et al., 2005). Nízká hladina plasmatického železa u některých pacientů s velmi intenzivními příznaky RLS byla popsána již Ekbomem. Studie potvrdily souvislost syndromu neklidných nohou se sníženými zásobami železa i bez projevů anémie. Dále byla prokázána korelace intenzity obtíží se sérovou hladinou ferritinu i při zachování normálních hodnot ostatních parametrů železa (O'Keefe et al., 1994). Konzistentně byly prokazovány snížené hladiny ferritinu a zvýšené hladiny transferinu v mozkomíšním moku, kdy hladiny v séru byly v normě. I u těchto pacientů hladina parametrů železa korelovala s intenzitou obtíží. (Earley et al., 2000). Při urémii a chronickém renálním selhání jsou u pacientů v dlouhodobém dialyzačním programu časté poruchy spánku a RLS a PLM patří k nejčastějším, v některých studiích byla prokázána prevalence 62- až 83procentní, v jiných pouhých 6,2 procenta. Avšak ve velkých studiích nebyla prokázána prevalence renálního selhání u pacientů s RLS vyšší než u nepostižené ostatní populace, a to i v populačních vzorcích respondentů starších padesáti let (Hogl et al., 2005).

U těhotných žen byl prokázán vyšší výskyt RLS než je v běžné populaci v odpovídajících věkových skupinách, tj. 11 až 26 procent, a to i v Asijské populaci, kde je prevalence RLS nižší (Suzuki et al., 2003). Během těhotenství často dochází ke zhoršení symptomů u žen, které zažívaly RLS již před otěhotněním a ve většině případů obtíže po porodu opět ustupují. U těhotných žen s RLS byla prokázána nižší hladina hemoglobinu (Manconi et al., 2004), v úvahu přichází deficit dalších mikronutrientů, jako jsou foláty.

Byla prokázána souvislost výšky prevalence RLS s počtem těhotenství u žen německého původu (Berger et al, 2004). Toto bylo potvrzeno v menší studii u těhotných (Suzuki et al., 2003), avšak jiná větší studie toto pozorování nepodpořila (Manconi et al. 2004). Vzhledem ke zlepšení příznaků RLS při dopaminergní léčbě se rovněž nabízí patofyziologická souvislost s Parkinsonovou chorobou. U pacientů s tímto onemocněním byl prokázán vyšší výskyt příznaků odpovídajících RLS (Ondo et al., 2002), avšak ve většině případů příznaky parkinsonismu předcházely rozvoji RLS. Dalším zdrojem nejistoty při hodnocení prevalence RLS u pacientů s Parkinsonovou chorobou je, že některé příznaky typické pro Parkinsonovu chorobu mohou být zaměněny za příznaky RLS – cirkadiánní fluktuace mohou připomínat cirkadiánní rytmicitu obtíží při RLS, vnitřní tremor je velmi analogický popisu nepříjemných pocitů, tak jak je udávají někteří pacienti s RLS a akathisie jsou provázeny nucením k pohybu, které je rovněž součástí diagnostických kritérií RLS. Dále dopaminergní léčba u pacientů s Parkinsonovou chorobou může maskovat projevy RLS, anebo způsobovat augmentaci, kvůli které se pak příznaky RLS prezentují ve vystupňované formě, často postihující jiné části těla, a v atypickou denní dobu. Účast genetických faktorů na etiopatogenezi syndromu neklidných nohou byla v poslední době opakovaně podpořena několika druhy pozorování. Prvním náznakem je vysoká prevalence u příbuzných prvního stupně, přibližně u poloviny nemocných je zachycena pozitivní rodinná anamnéza, a to více u forem idiopatických s nástupem v mladším věku. Mezi kandidátní geny, které by mohly ovlivňovat patogenezi choroby, patří pro zjevnou úzkou souvislost s dopaminergní neurotransmisí sekvence kódující enzymy účastníci se syntézy a odbourávání dopaminu. Jedním z klíčových je mitochondriální enzym MAO-A, který katabolizuje bioaktivní aminy oxidativní deaminací a kromě dopaminu degraduje převážně serotonin a noradrenalin. Bylo prokázáno, že ženy nesoucí alely s vyšším funkčním potenciálem trpí častěji RLS a ten u nich bývá těžší ve smyslu delšího času do usnutí a častějších pohybů. U mužů nebyla tato souvislost pozorována (Desautels et al., 2002). Předběžné studie zabývající se typem dědičnosti u syndromu neklidných nohou nabízí dvě hypotézy. Převládající názor předpokládá, že u rodinných forem RLS s časným nástupem obtíží (před 30. rokem věku) se jedná o autozomálně dominantní dědičnost (Winkelmann et al., 2002, Kemlink et al., 2003). Pozitivní rodinná anamnéza u idiopatického RLS je udávána dle různých studií mezi 40,9–92 % (Barrière et al. 2005), v rámci rodokmenů byla heritabilita stanovena na 0,6 (Chen et al., 2004). Rovněž u jednovaječných dvojčat byla zjištěna vysoká konkordance, avšak intenzita i věk při nástupu obtíží se často výrazně lišily (Ondo et al., 2000). V některých rodokmenech bylo pozorováno, že pacienti v nižších generacích udávají nástup obtíží v nižším věku než jejich předkové. Vzhledem k tomu bylo vysloveno podezření, že v rámci syndromu RLS může docházet k anticipaci. Tento fenomén, kdy potomci pacientů, pokud zdědí chorobu, mají obtíže dříve a jsou závažnější, je často pozorován u některých autosomálně dominantních onemocnění způsobených expanzí trinukleotidů, které se při meiosách prodlužují. Při pokusu o statistické hodnocení rodin s více generacemi byla anticipace spolehlivě prokázána v jedné z pěti rodin, v druhé z těchto rodin byl výsledek pouze sugestivní (Lazzarini et al., 1999). Možná asociace RLS

s onemocněními spojenými s expanzí trinukleotidů byla hodnocena ve studii, kdy u pacientů trpících RLS bylo provedeno vyšetření délek trinukleotidových repetic v genech SCA 1, 2 a 3. Nebyly však prokázány signifikantní prodloužení těchto repetic ve srovnání s kontrolní populací a rovněž u pacientů s RLS nebyly délky expanzí v mezích svědčících pro onemocnění z okruhu SCA (Lichtner et al., 2005, nepublikovaná data).

První vazebná studie, která úspěšně odhalila oblast genomu ve statisticky významném vztahu k onemocnění, byla provedena na velké rodině frankofonních Kanadánů. Naznačuje umístění kandidátního genu na dlouhé raménko chromozomu 12 (*RLS1*), ale svědčí spíše pro autozomálně recesivní dědičnost s vysokým zastoupením heterozygotů ($p=0,75$) v populaci (Desautels et al., 2001), takže pak dochází k situaci, kdy v rodinách je jeden z rodičů postižený homozygot a jeho partner je nepostižený heterozygot. Polovina jejich potomků je postižená stejně, jako by tomu bylo v případě autosomálně dominantní dědičnosti (pseudodominance).

Druhá pozitivní genetická vazba byla nalezena v rodině původem ze severní Itálie a to sice s chromozomální oblastí 14q (*RLS2*). V této rodině byl pozitivní výsledek prokázán naopak na podkladě autosomálně dominantního modelu (Bonati et al., 2003), avšak v rámci této studie byla za projevy RLS považována i přítomnost PLMS bez anamnestických projevů RLS.

Třetí lokus (*RLS3*) byl nalezen v sadě 15 amerických rodin z Texasu na dlouhém raménku chromozomu 9 nejprve neparametricky, v některých rodinách byla prokázána vazba i parametricky za předpokladu autosomálně dominantního modelu (Chen et al., 2004). Další dvě oblasti s pozitivní vazbou byly nalezeny ve velké rodině bavorského původu na chromozomu 4 a 17. Model byl rovněž autosomálně dominantní dědičnost s úplnou penetrancí, s předpokládanou frekvencí genu podmiňujícího RLS $p=0,003$ a pravděpodobností výskytu RLS v rodině na vrub jiné příčiny než předpokládaného genu (phenokopie) $f_0=0,005$ (dosud nepublikovaná data Winkelmann et al., 2006).

Pět zjištěných oblastí s pozitivní vazbou v rámci různých populací, přičemž jeden z nich byl již potvrzen ve více populacích, významně nasvědčuje spíše komplexnímu multifaktoriálnímu typu dědičnosti (Desautels et al., 2005, Winkelmann et al., 2006).

Cíle studií

Cílem klinické části práce bylo identifikovat pacienty s familiární formou RLS v souboru pacientů s RLS vyšetřených na Neurologické klinice 1. LF UK a VFN a u těchto pacientů uskutečnit screeningová biochemická a hematologická vyšetření z periferní krve za účelem odhalení případného primárního onemocnění vyvolávajícího RLS a k odhalení případných biochemických a hematologických odlišností familiární a sporadické formy RLS a vytipování parametrů vhodných jako vstupní parametr k vyhledávání genetických determinant RLS. Vzhledem k vysoké prevalenci RLS je pravděpodobné, že v rodinách s více postiženými RLS se může vyskytnout i případ sekundární u člena, který nesdílí stejnou genetickou příčinu, která je přítomna u ostatních členů (phenokopie). Tento jev výrazně snižuje efektivitu genetických vazebných a asociačních studií. Proto identifikace

klinického či biochemického markeru, který by usnadňoval identifikaci phenokopii v rodokmenech, by pro další výzkum představovala výrazný přínos.

Genetická část projektu se skládala ze dvou studií. V první studii byly vyšetřovány rodiny se zaměřením na již publikované oblasti (*RLS1*, *RLS2*, *RLS3*) a dosud nepublikovanou oblast chromozomu 4. V této části jsme pracovali s rodinami probandů z našeho souboru, u kterých v rodokmenech byli minimálně dva sourozenci s definitivní diagnózou RLS a byli ochotni poskytnout svou DNA.

V druhé části bylo pracováno s rodinami shromážděnými v rámci projektu EU-RLS-GENE z dalších 13 evropských center a k analýze byly použity ty rodiny, kde byli minimálně dva postižení a alespoň od jednoho z nich byla k dispozici DNA jak postiženého, tak i obou jeho rodičů (bez ohledu na to, zda rodiče sami trpí RLS či nikoliv). Tento druh nukleárních rodin se běžně nazývá „trio“. Kromě těchto příbuzných byly vyšetřeny další čtyři velké rodiny (finského, italského, rakouského a německého původu), u nichž bylo možné předpokládat vzhledem k jejich struktuře záchyt eventuální genetické determinanty. V rámci tří byly rovněž vyšetřeny oblasti *RLS2*, *RLS3*, dále části chromozomu 17 a 4 dle nepublikovaných dat, a nakonec částí chromozomu 10 a 19 dle výsledků nalezených ve výše zmíněné italské rodině.

Pacienti a metody

Klinická studie

Do studovaného souboru byli zařazeni všichni nemocní, kteří jednoznačně splnili kritéria RLS. Pokud diagnóza byla stanovena dříve, byla znovu verifikována její platnost při klinickém vyšetření. K určení závažnosti bylo použito čtyřicetibodové škály intenzity (IRLSGSG 2003).

Standardně u nemocných s RLS byla prováděna následující laboratorní vyšetření: počet leukocytů, červený krevní obraz včetně počtu retikulocytů a parametry trombocytů, mineralogram včetně hladin hořčíku a vápníku a fosforu, panel jaterních enzymů, krevních lipidů a hladina celkové bílkoviny s albuminem, parametry metabolismu železa – hladina sérového železa, vazebná kapacita pro železo, transferinu a ferritinu v séru včetně solubilního transferinového receptoru. Dále byl stanovován erythropoetin (metodou RIA). Vzhledem k různým věkovým skupinám zastoupeným v souboru a nerovnoměrnému zastoupení pohlaví typickém u pacientů s RLS byly biochemické parametry standardizovány na odpovídajícím průměru a směrodatné odchylce v referenční populaci pro dané pohlaví a věkovou skupinu. Výsledkem pak pro jednotlivé hodnoty byl rozdíl aktuální hodnoty pacienta a průměru vztaženého k jedné směrodatné odchylce. Vzhledem k tomu, že rozdělení hodnot se ve většině případů významně lišilo od normálního při hodnocení pomocí Shapiro-Wilkova W testu, byl ke srovnávání skupin sporadických a rodinných forem RLS používán Man-Whitney test. Ke korelační analýze byl používán neparametrický Spearmanův test, pro každou vyšetřovanou sadu testů byla použita korekce pro vícečetná testování pomocí Bonferroniho algoritmu, při daném počtu vyšetření se tedy jednalo o prahovou hodnotu $p = 0,0014$ pro hladinu $\alpha = 0,05$.

Genetické studie

Pacienti byli vyšetřováni převážně ve svém domácím prostředí, nejdříve na podkladě anamnézy byla stanovena či nepotvrzena diagnóza RLS, v případě pozitivy i vyhodnocena škála intenzity obtíží, byly anamnesticky shromažďovány informace o eventuálních dalších onemocněních a provedeno orientační klinické vyšetření. Po získání písemného informovaného souhlasu byla odebrána periferní krev k izolaci DNA. Pokud byli dostupní i další příbuzní, byla od nich získávána DNA dle stejné procedury, i když nebyli postižení a zároveň byli starší 30 let. Podle stejného algoritmu probíhala vyšetření v dalších 13 centrech v sedmi evropských zemích, každé centrum získávalo vlastní souhlas etické komise. V našem centru probíhala vyšetření na základě souhlasu etické komise 1. LF UK a VFN v Praze. Anonymně označená DNA byla izolována a centrálně skladována v Národním centru pro výzkum zdraví a životního prostředí v Mnichově, SRN (GSF), v Institutu lidské genetiky (IHG), kde rovněž probíhala veškerá molekulárně genetická laboratorní vyšetření. K těmto procedurám byl vydán souhlas etické komise Bayerische Ärztekammer, München.

Genotypizace mikrosatelitních markerů

Genomická DNA byla izolována z leukocytů periferní krve pomocí standardních protokolů pro alkohol-precipitační metodu. Analýzy kandidátních regionů byly prováděny pomocí mikrosatelitních markerů. Mikrosatelitní marker představuje část DNA, která není součástí oblastí kódujících geny, jedná se o sekvenci, která se vyskytuje v genomu člověka pouze v jediném lokusu (sequence tagged site – STS). Celkem je v rámci jednoho markeru vyšší počet alel, typicky 6 až 20. Mikrosatelitní markery nijak neovlivňují funkci genomu – jedná se o tzv. anonylní markery.

Sekvence primerů pro mikrosatelitní markery byly získány z databáze The Human Genome Database (GDB; www.gdb.org). Genetické pozice byly převzaty ze sad Marshfield maps (Broman et al., 1998 – research.marshfieldclinic.org/genetics/) a fyzické pozice a přiřazení jednotlivých genů k těmto pozicím bylo provedeno podle verze sekvence lidského genomu z května 2004 (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001), ke kterému bylo přístupováno prostřednictvím prohlížeče UCSC genome browser (genome.ucsc.edu). Polymerázová řetězová reakce (PCR) probíhala pomocí standardního protokolu. Amplifikační produkty byly vyhodnocovány pomocí kapilární elektroforézy za denaturačních podmínek pomocí sekvenceru ABI 3730.

Délka produktů byla vyhodnocována semiautomaticky pomocí systému Genemapper software v 3.5 (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), veškeré hodnoty byly manuálně kontrolovány.

V rámci vazebné studie u českých rodin bylo vyšetřeno šest markerů pokrývajících 89 cM (91 Mbp) na chromosomu 12q, šest markerů pokrývajících 28 cM (29 Mbp) na chromozomu 14q a 10 markerů na 31 cM (20,5 Mbp) dlouhém regionu chromozomu 9p. Dalších 10 markerů bylo rozmístěno na 50 cM (54,5 Mb) segmentu chromozomu 4q.

Při analýze trií byly vyšetřeny segmenty pomocí 10 markerů pokrývajících 10 cM (10.5 Mbp) na chromozomu 14q a 19 markerů na 36 cM (22 Mbp) dlouhém regionu chromozomu 9p. Dalších 14 markerů bylo rozmístěno na 25 cM (31 Mb) segmentu chromozomu 4q a 12 markerů v 30 cM (16 Mb) dlouhé oblasti chromozomu 17p. Dle výsledků vazebné studie celého genomu pomocí SNP markerů v rodině B008 bylo doplněno genotypizování osmi mikrosatelitních markerů na chromozomu 19p zabírajících 11 cM (6 Mbp) a sedm markerů na chromozomu 10p pokrývajících oblast 10 cM (3.8 Mbp).

K potvrzení nálezu pozitivní vazby v rámci studie se SNP markery byly vyhodnoceny v rodině B008 na chromozomu 10 stejné mikrosatelitní markery jako u trií, na chromozomu 19p bylo použito 13 markerů zabírajících 18 cM (24 Mbp).

Vyhodnocení SNP markerů

U vybraných rodin bylo provedeno vyšetření pokrývající celý genom člověka (genome-wide scan) pomocí systému Illumina Golden Gate assay a komerční sadou Illumina Linkage Panel IV (Illumina, Inc., 9885 Towne Centre Drive, San Diego, CA 92121–1975, USA). Sada sestává z 5861 ověřených jednonukleotidových polymorfismů (Single Nucleotide Polymorphism SNP), které jsou rozmístěny průměrně na každých 0,64 cM. Vzhledem k malému počtu alel je pro vazebné studie výpovědní hodnota SNP markerů nižší než u mikrosatelitních markerů, a proto jich musí být vyhodnoceno více (4–7 SNP markerů pro jeden mikrosatelitní).

Sekvence

Dva kandidátní geny byly vyšetřeny přímou sekvenací všech exonů a přilehlých sestřihových míst. Primery pro sekvenaci byly navrženy pomocí programu ExonPrimer se vstupními daty podle aktuální verze sekvence lidského genomu (květen 2004), vše prostřednictvím UCSD genome Browser. Jednotlivé exony byly nejdříve amplifikovány standardní PCR, produkt byl očištěn od nespotebovaných reagentů pomocí ultrafiltrace a na gelové koloně DyeEx, oba řetězce byly sekvenovány pomocí soupravy reagentů BigDye terminator chemistry 3.1 (Soupravy a kolony Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Vyhodnocení produktů proběhlo rovněž na přístroji ABI 3730. Výsledky byly prohlíženy pomocí programů Pregap a Gap ze systému Staden (Staden et al 2003).

Statistická analýza

Veškerá výsledná data získaná při genotypizaci byla nejdříve kontrolována pomocí programu PEDCHECK v1.1 (O'Connell 1998), který odhalí eventuální chyby ve struktuře rodokmenů způsobené chybou při genotypizaci, mutací ve vyhodnocovaném markeru nebo nejčastěji non-patnitou.

Vazebná analýza v rámci celých rodin byla prováděna nejdříve parametricky, za předpokladu autosomálně dominantního modelu s přepokládanou frekvencí genu RLS v populaci $q=0,003$, úplnou penetrancí a výskytem phenokopí s pravděpodobností 0,005, tedy na podkladě modelu zjištěného segreganční analýzou (Winkelmann et al., 2002).

Druhým nastavením parametrů byl autosomálně recesivní model s vysokým zastoupením heterozygotů s předpokládanou frekvencí genu v populaci $q=0,25$, penetranci u heterozygotů a zdravých homozygotů odpovídající frekvenci fenokopii (0,005) a penetranci u postižených homozygotů nesoucích obě postižené alely 80%.

Další alternativou je testování neparametrickými metodami, které nevyžadují žádné předpoklady, avšak pozitivní výsledek není jednoznačně interpretovatelný ve smyslu etiologické souvislosti. Výsledek se vždy vztahuje pouze k testovanému vzorku rodin a je posuzován hodnotou p , která vyjadřuje pravděpodobnost, že rozdíl v rozdělení genotypů v daném markeru u zdravých a postižených jedinců je pouze náhodný. Hodnota získaná pro jeden marker musí být korigována dle počtu použitých markerů a vazby mezi nimi. Orientačně však lze považovat hodnotu výsledného Z-score vyšší než 4 za sugestivní. Pro vyhodnocení vyšetření celého genomu SNP markery byl použit program Merlin 0.10.2 (Abecasis 2002), vyhodnocování částí chromozomů probíhalo pomocí systému GENEHUNTER 2.1 (Daly et al 1998).

K určení maximálního očekávatelného a průměrného LOD skóre ve srovnání se získaným výsledkem se používá opakovaných simulací vazby zjišťovaného onemocnění s určitým markerem, u nějž jsou výsledky genotypizace vytvářeny náhodně podle zadaných parametrů (počet alel, jejich frekvence). V této studii byl používán simulační program SLINK (Ott, 1989, Weeks et al., 1990) pro hodnocení výsledků studií pro celý genom pomocí SNP markerů.

Statistické hodnocení nerovnováhy rozdělení alel (Transmission Disequilibrium Test – TDT) u postižených pacientů a jejich rodičů kromě neparametrické vazby při použití na větší rodokmeny, navíc umožňuje i detekovat asociace mezi konkrétní alelou a testovanou chorobou. Principem je porovnání četnosti, kdy alela od heterozygotního rodiče byla přenesena na pacienta ve srovnání s číslem, kolikrát tato stejná alela přenesená nebyla. Výsledek je porovnáván pomocí χ^2 testu se situací, kdy je přenos všech alel s pravděpodobností 50 procent. Pro vyhodnocování mikrosatelitních markerů, které mají více než dvě různé alely, byl použit jednak test z programu ETDT 2.5 (Sham a Curtis 1995), Tento program nabízí dvě testovací metody: 1. standardní alelický test hodnotící přenos alel na potomky nezávisle na celém genotypu rodičů a 2. alternativní test genotypový zohledňující přenos z různých genotypů u rodičů. Tento test hodnotí pouze jednotlivé markery, haplotypy (specifické sekvence genotypů v sousedících markerech) musí být vytvářeny jiným systémem. K tomuto účelu byl použit systém GENEHUNTER 2.1. Jako alternativa pro vyhodnocování haplotypů byl použit program TDTPHASE ze statistického balíku UNPHASED 2.403 (Dudbridge 2003). Tento program vytváří haplotypy z větších rodokmenů, avšak neobsahuje alternativní genotypový test. Pozitivní výsledky obou programů pro TDT je třeba testovat pomocí permutací k určení hodnoty empirické hodnoty p , která vyjadřuje, kolik náhodných simulovaných přenosů alel v daných rodokmenech dosahuje stejně statisticky významných výsledků jako je ten skutečný. Tato korekce je nutná zejména v případech, kdy tria vznikají z větších rodokmenů a někteří testovaní jedinci jsou tedy příbuzní. Počet iterací musí být tak vysoký, aby bylo dosaženo

minimálně 10 lepších náhodných výsledků než je výsledek získaný, v našem případě bylo pro hladinu $p < 0,05$ používáno 1000 simulovaných rodokmenů, pro $p < 0,05$ bylo nutných 10 000 opakování.

Výsledky

Klinická část

Od roku 2002 do konce roku 2005 bylo v ambulanci Centra pro poruchy spánku a bdění Neurologické kliniky 1. LF UK a VFN diagnostikováno celkem 311 pacientů s RLS (65,3 % žen, průměrný věk byl 54,6 roku, SD 14,7 roku), 96 z nich (tedy 31 %) udávalo pozitivní rodinnou anamnézu (64,6 % žen, průměrný věk při vyšetření 53,1 roku, SD 15,8 roku). Do souboru nebyly zařazeni žádní pacienti se známkami těžkého renálního selhání, v dialyzačním programu či po transplantaci ledvin, ani těhotné ženy.

U 228 pacientů bylo možné získat rámcový údaj o věku při nástupu obtíží. V tomto parametru byl nalezen signifikantní rozdíl ($P < 0,0001$) při porovnávání sporadických a familiárních forem.

U 183 pacientů byla provedena výše uvedená laboratorní vyšetření. Výsledky vyšetření prokázaly signifikantní rozdíl na hladině $\alpha = 0,05$ v počtu červených krvinek mezi sporadickými a familiárními formami onemocnění ($Z = -2,02$, $p = 0,043$), který byl v mediánu u sporadických forem nižší.

Nejtěsnější byla souvislost mezi hladinou erythropoetinu a přítomností RLS – 51 procent pacientů s familiární RLS mělo hladinu nižší než jsou dvě směrodatné odchylky od příslušného průměru, u sporadických RLS to bylo 46 procent pacientů. Celkově 87 procent nemocných mělo hladinu nižší než je průměr. Rozdíl mezi sporadickými a familiárními formami však není signifikantní.

Pouze 12 pacientů trpělo anémií bez prokazatelné poruchy metabolismu železa, tři z nich měli pozitivní rodinnou anamnézu, u dalších pěti pacientů byla zachycena anémie se sníženou hladinou ferritinu, jeden z nich měl pozitivní rodinnou anamnézu. Toto zastoupení sekundárních forem není statisticky odlišené mezi familiárními a sporadickými případy. Tabulka 4 shrnuje počty pacientů rozdělené do skupin podle rodinné anamnézy a počty pacientů, u kterých byly hodnotitelné dané parametry. Skupiny byly homogenní, věk ani zastoupení pohlaví se mezi skupinami v žádném parametru signifikantně nelišily.

Pro všechny vyšetřované laboratorní parametry byla provedena korelační analýza s klinickými nálezy – tedy věk, věk při nástupu obtíží RLS a intenzitou obtíží RLS podle výsledku škály. Vzhledem k opakovaným testováním s jedním parametrem bylo nutné použít korekci. Signifikantní výsledek byl tak nalezen pouze pro korelaci mezi aktuálním věkem pacientů a hladinou urey, což nepředstavuje žádný relevantní výsledek ve vztahu k RLS.

Genetická část – vazebná studie u rodin českého původu

Do vazebné části studie bylo zařazeno 10 rodin českého a slovenského původu. Genotypizováno bylo celkem 49 jedinců, 36 z nich trpělo RLS, 22 bylo ženského pohlaví. Průměrný věk nástupu příznaků RLS byl v této skupině 27,4 roku, \pm SD 14,2 roku.

Vzhledem k takto nízkému věku při nástupu obtíží byli zařazeni všichni postižení pacienti. Vazebné studie, jak za předpokladu autosomálně dominantního modelu, tak autosomálně recesivního, neprokázaly $LOD > 2$ jak v jednotlivých rodinách, tak i v celkovém součtu.

Rovněž standardní neparametrický test se všemi postiženými členy rodin neprokazoval ve vyšetřených chromozomálních oblastech známky významné vazby.

Jednoznačně negativní nálezy vylučující vazbu dle zadaného modelu v rámci vyšetřených rodin byl pro recesivní model na chromozomu 4 pro oblast s markery D4S1572 a D41531, dále D4S413, na chromozomu 12 u markeru D12S78, na chromozomu 14 pro oblast u markeru D14S275, a oblast s markery D14S1048 až D14S301. Pro tento model nebyla formálně vyloučena vazba pro žádný marker na chromozomu 9. Pro dominantní model byla vazba vyloučena v celém vyšetřeném regionu chromozomu 4, 9 a 14, na chromozomu 12 pro všechny markery až na D12S395.

V rámci těchto rodin bylo doplněno jako neparametrický test rovněž TDT pro jednotlivé mnohoalelické markery pomocí programu ETDT. Na chromozomu 9 sugestivní nálezy pro marker D9S286 nebyly po permutacích potvrzeny, protože výsledné empirické p již signifikantní nebylo. Na chromozomu 12 pro marker D12S78 byly nalezeny hodnoty pro alelický test $p = 0,008245$, empirické $p = 0,0210$, pro genotypický test $p = 0,016903$, empirický $p = 0,0340$.

Genetická studie – Studie EU-RLS-GENE – vyšetření celého genomu a sekvenace

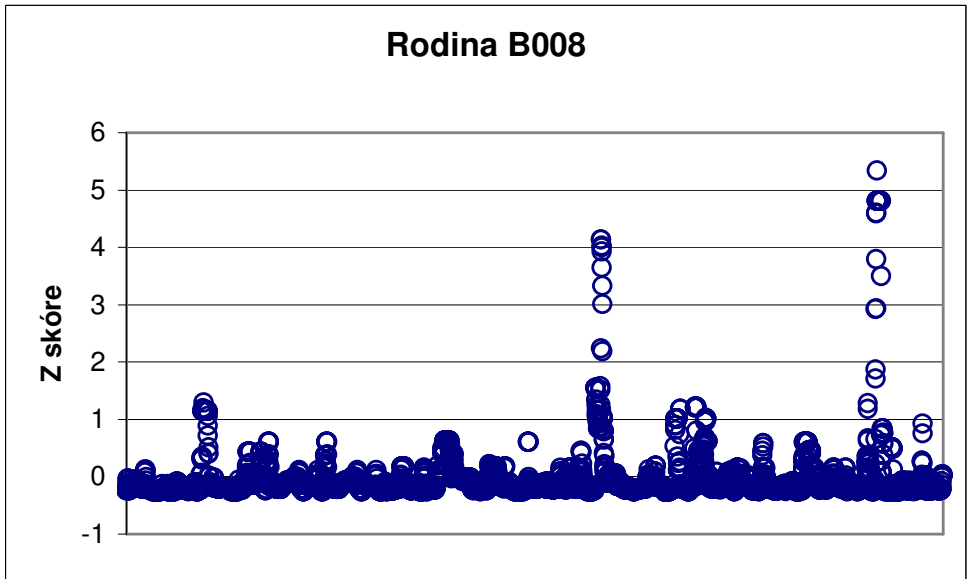
V rámci celé evropské studie EU-RLS-GENE bylo nashromážděno DNA od 1758 jednotlivců z 281 rodin ze 14 center v 8 státech. Celkem v rámci těchto rodin bylo 1226 pacientů s familiární formou RLS, 69,1 procenta tvořily ženy. Průměrný věk pacientů byl 51,3 roku, SD 18,0, průměrný věk při nástupu obtíží byl 28,6 roku, SD 15,7 roku.

K vyšetření celého genomu pomocí SNP markerů byly vybrány čtyři rodiny (po jedné T001 finského, RLS00236 německého, I002 rakouského a B008 italského původu), které měly vhodnou strukturu a dostatečnou velikost k samostatným pozitivním výsledkům vazebné analýzy. V rodině I002 byl nálezy max. LOD 2,33 při výše uvedeném autosomálně

dominantním modelu na chromozomu 7 mezi markery: rs12217 – rs13068. Vzhledem k velikosti rodiny při simulacích pomocí systému SLINK bylo nalezeno 23 procent LOD skóre vyšších než 3 a maximum bylo 3,41. Vzhledem k těmto výsledkům nelze výsledek považovat za náznak nového lokusu – empirické p pro LOD 2,33 v této rodině je 0,383.

U rodiny B008 bylo maximální LOD skóre dosažené při simulacích 2,74 na podkladě obecného autosomálně dominantního modelu. Neparametricky byly nalezeny sugestivní oblasti na chromozomech 10 a 19 (viz graf 1). Při parametrickém hodnocení na podkladě dominantního modelu na chromozomu 10 byla maximální hodnota 1,06 u markeru rs1537632. Na chromozomu 19 byla maximální hodnota LOD 2,61 nalezena mezi markery rs754292 a rs273265. Pro tyto oblasti byly vybrány mikrosatelitní markery a pomocí programu GENEHUNTER bylo provedeno jemné mapování. Na chromozomu 10 bylo u markeru D10S1728 potvrzeno LOD 1,11. Na chromozomu 19 bylo pozorováno LOD 2,57 mezi markery D19S429 a D19S915. Potvrzení vazby pomocí parametrického hodnocení jak

s použitím SNP markerů, tak i mikrosatelitních markerů představovaly výsledek, který vedl k další analýze této oblasti v následující studii. V oblasti maximálního LOD skóre v rodině B008 i asociace s daným haplotypem v rámci evropských trií se vyskytují dva velmi slibné kandidátní geny KCNN a Rab3a. Při sekvenaci kódujících oblastí u postižených jedinců v rodině B008 nebyly nalezeny rozdíly oproti zdravé kontrole ani významné interindividuální odchylky.



Graf 1 – Výsledek vyšetření celého genomu pomocí neparametrické vazebné analýzy. Každý bod představuje hodnotu v jednom SNP markeru.

Genetická studie – asociační studie v rámci rodin

Z rodin ve studii EU-RLS-GENE bylo vybráno 159 kompletních trií (107 žen, 52 mužů) z 87 rodin s celkem 362 jednotlivci. Z nich 273 bylo postiženo RLS (64,5 % žen, průměrný věk 48,5 roku, SD 17,16 roku, průměrný věk při nástupu příznaků RLS byl 26,3 roku, SD 14,63 roku). Tria byla hodnocena jednak společně, dále byla rozdělena podle jejich původu – severní Evropa (Finsko) 76 trií, střední Evropa (Německo, Rakousko, Česká republika) 52 a jižní Evropa (Itálie, Řecko) 31 trií.

Při analýze TDT u trií na chromozomu 4 nebyla v rámci všech rodin nalezena jak žádná signifikantní asociace (definovaná jako empirické $p < 0.01$), tak ani sugestivní (definovaná jako empirické $p < 0.05$). U rodin severoevropského původu byla prokázána signifikantní asociace s markerem D4S1572.

Na chromozomu 9 rovněž nebyla nalezena žádná signifikantní asociace v rámci všech rodin, nejnižší hodnota p byla pouze v sugestivní oblasti v asociaci s haplotypem D9S1846-D9S171. Při analýze podskupin byly zachyceny signifikantní asociace rovněž s haplotypem D9S1846-D9S171 v rodinách jihoevropského původu a s haplotypem D9S156-D9S157 při podanalýze rodin pocházejících ze střední Evropy. Při hodnocení jihoevropských rodin byly na analyzované části chromozomu 9 zachyceny velmi četné sugestivní výsledky.

Na testovaném segmentu chromozomu 10 nebyly nalezeny žádné signifikantní asociace, pouze jedna sugestivní, vzhledem k celkově negativním výsledkům nebyly na tomto chromozomu analyzovány delší haplotypy.

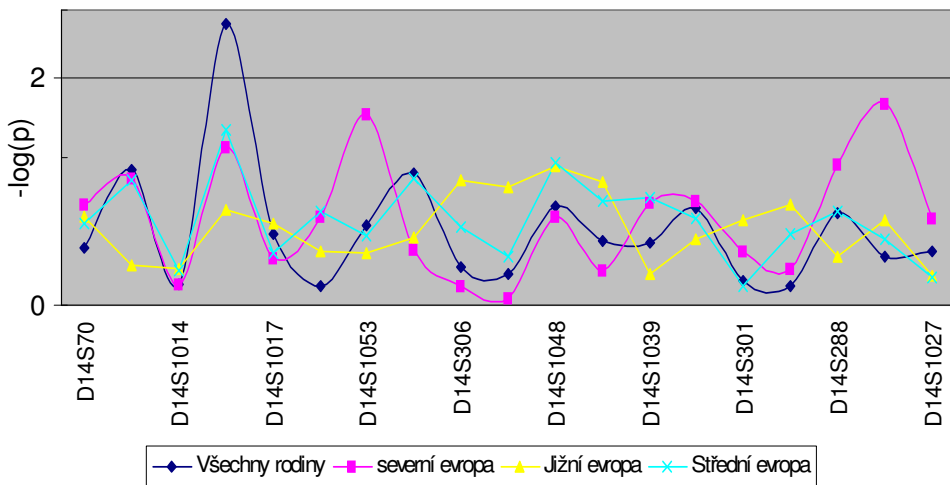
Na chromozomu 14 při hodnocení všech tří byla nalezena signifikantní asociace s haplotypem tvořeným markery D14S1014-D14S1017. Tento nález je rovněž podpořen sugestivními nálezy v podskupinách rozdělených dle geoetnického původu.

Na chromozomu 17 byla nalezena signifikantní asociace s markerem D17S921. Tento nález je rovněž podpořen sugestivním výsledkem u tří středoevropského původu ve stejném markeru a v haplotypu D17S921-D17S1843. Další signifikantní výsledek na tomto chromozomálním segmentu byl nalezen rovněž v podskupině rodin ze střední Evropy a to s haplotypem D17S1857-D17S2196, což je oblast, kde byla zachycena nejtěsnější vazba v rámci parametrické vazebné analýzy v jedné rodině bavorského původu (Winkelmann et al. – nepublikováno).

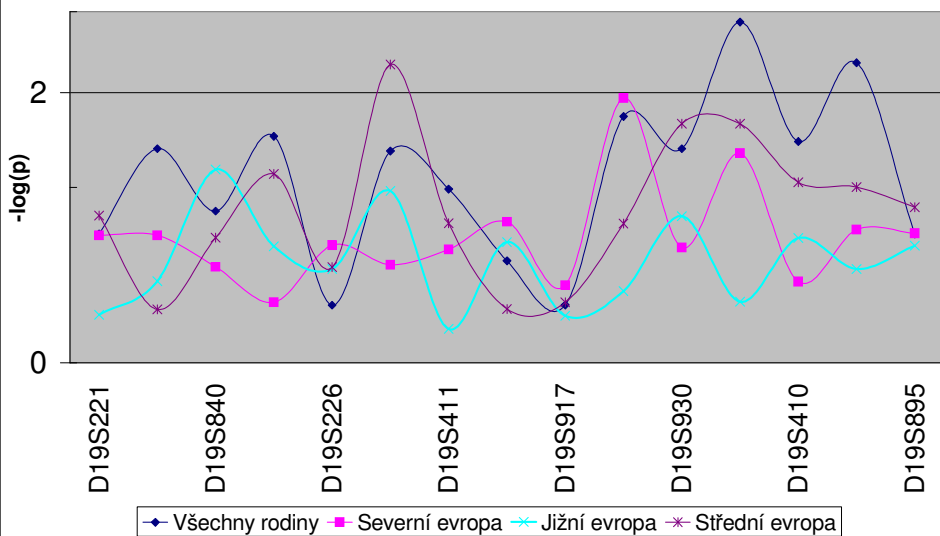
Na chromozomu 19 v rámci analyzovaných markerů byla nalezena signifikantní asociace v celém vzorku s dvěma sousedícími haplotypy D19S930-D19S410 a D19S410-D19S895. Další signifikantní asociace byla nalezena v podskupině tří původem ze střední Evropy s haplotypem D19S226-D19S411.

Pro ilustraci na Grafu 2 jsou vyobrazeny asociace na oblastech chromozomů 17 a 19. Grafy pro jednotlivé chromozomální úseky vyjadřují výsledky asociční analýzy jako záporné dekadické logaritmy hodnot empirického p získaného permutacemi. Hodnoty vyšší než 2 (tedy $p < 0,01$) byly považovány za signifikantní. Hodnoty u jednotlivých markerů odpovídají výsledkům jednotlivých markerů, hodnoty mezi popisky odpovídají výsledkům u haplotypů tvořených párem těchto markerů.

Chromosom 14q21



Chromosom 19p11



Diskuse

Literatura udává u více než 40 procent idiopatických případů pozitivní rodinnou anamnézu (Winkelmann et al., 2000), v našem vzorku byl familiární výskyt RLS u 23 procent pacientů s primárním onemocněním. Dle pozorování v německé populaci je RLS s familiárním výskytem a nástupem příznaků před 30. rokem života pravděpodobně způsoben jedním genem, což představuje přibližně polovinu pacientů trpících RLS, kteří měli pozitivní rodinnou anamnézu. Naopak objeví-li se příznaky později, je patogeneze syndromu ovlivňována více geny i enviromentálními faktory. (Winkelmann et al., 2002). I naše studie našla významný rozdíl ve věku nástupu obtíží mezi sporadickými a familiárními formami. Mezi těmito skupinami nebyl nalezen signifikantní rozdíl v intenzitě obtíží či v parametrech metabolismu železa. S hraniční signifikancí byl nalezen u sporadických forem o málo nižší počet erytrocytů. Dále bylo naopak u familiárních forem nalezeno hraniční snížení hladiny erythropoetinu oproti referenční populaci, avšak u sporadického RLS nebyl tento pokles tak výrazný a rozdíl mezi těmito podskupinami není významný. Přesto tato studie jako první poukazuje na možnou abnormalitu v systémech spojených s erythropoetinem v rámci RLS. Pomocí vazebných analýz v 11 rodinách českého původu nebyl potvrzen žádný z publikovaných lokusů na chromozomech 12, 14 a 9 (*RLS1*, *RLS2*, *RLS3*) i na dosud nepublikovaném lokusu chr. 4. Autosomálně dominantní model byl formálně vyloučen v našich rodinách v prakticky v celém zkoumaném rozsahu. Autosomálně recesivní model s vysokým zastoupením heterozygotů a 80procentní penetrancí je model, který vzhledem k těmto parametrům prakticky lze vyloučit jen obtížně, přesto některé části zkoumaných chromozomálních úseků kritérium k vyloučení splnily. V původní práci (Desautels et al., 2001) bylo maximální dosažené LOD score dvoubodové pro marker D12S1044, který se nachází na 97,6cM, mělo hodnotu 3,5 pro rekombinační frakci 0,05 (tedy cca 5cM od daného markeru). Toto pozorování bylo potvrzeno v dalších pěti rodinách stejného původu a pomocí stejného genetického modelu (Desautels et al., 2005). Další potvrzení tohoto lokusu je na podkladě neparametrického testu nerovnováhy přenosu alel (transmission disequilibrium test – TDT) v rámci rodin německého původu (Winkelmann et al., 2006) s markerem D12S78 na 111,87 cM chromosomu 12. Třetím potvrzením pro *RLS1* bylo ze 108 rodin z islandské populace, a bylo provedeno pomocí neparametrických vazebných testů. Zdá se pravděpodobné, že tento lokus byl tedy poměrně dobře ověřen, autosomálně recesivní model dědičnosti je však prokazatelný pouze v rodinách Kanadánů francouzského původu, ostatní výsledky svědčící pro vazbu v lokusu *RLS1* byly získány pomocí neparametrických testů, které model dědičnosti nezohledňují. Z neparametrických testů byl v naší studii pomocí TDT skutečně pozitivní nález asociace s markerem D12S78, který je v úseku lokusu *RLS1*. Tento výsledek společně s dalšími pozorováními v rámci této oblasti genomu (Deautels et al., 2005, Winkelmann et al., 2006, Hicks et al., 2005), která prokázala pozitivní vazbu nebo asociaci s částí tohoto chromozomálního regionu, přesvědčivě prokazují vliv *RLS1* v etiopatogenezi RLS. V oblasti, kde se všechna pozorování prolínají, se vyskytuje minimálně sedm genů, které by potenciálně mohly mít souvislost s patogenezi RLS, nejslibnějším z nich se zdá být SYCP3 –

synaptolemální protein, který se podílí na exocytose neurotransmitterů, avšak tento gen není v leukocytech periferní krve exprimován.

Při vyhodnocování vazebné studie s celým genomem ve vybraných rodinách ze vzorku EU-RLS-GENE byla v jedné rodině italského původu nalezena sugestivní vazba na oblasti chromozomu 19. Výsledek byl nejdříve pozorován pomocí neparametrických testů, byl konzistentní i s předpokládaným autosomálně dominantním modelem pro RLS na základě segreganční analýzy v německé populaci (Winkelmann et al., 2002). Přestože výsledek nespĺňoval kritéria prokazující vazbu po provedení vyšetření celého genomu, získaná hodnota LOD při vyšetření pomocí parametrických testů dosahovala téměř maximální hodnoty, která byla pomocí stejného modelu observována při simulacích v rámci této rodiny. Proto tato oblast byla dále testována v rámci tří ze stejného projektu, za účelem eventuálního potvrzení v nezávislém vzorku.

Vzhledem k rostoucímu počtu popsaných lokusů pomocí vazebných analýz, které však nebylo možné potvrdit v jiných rodinách, se část autorů začala přiklánět k názoru, že RLS je pravděpodobně geneticky heterogenní a spíše komplexního typu dědičnosti (Desautels et al., 2005, Winkelmann et al., 2006). Pro tento druh dědičnosti jsou vhodnější asociační metody, které jsou aplikovatelné na nashromážděné rodiny v rámci projektu EU-RLS-GENE. TDT detekuje jak neparametricky vazbu, tak i asociaci a je použitelný i na rodokmeny. Navíc je tento test odolnější než vazebná analýza na chyby či nepřesnosti při stanovování diagnózy, protože ta musí být přesně stanovená pouze u potomka, jeho rodiče musí být pouze genotypizováni, ale zda jsou postižení či nikoliv, roli nehraje. Tento test rovněž nevyžaduje kontrolní skupinu, tak jak je to nutné u standardních asociačních testů a není ovlivněn nerovnoměrným rozdělením alel v testované populaci. Permutační analýza dále vylučuje falešně pozitivní výsledky vznikající tehdy, pokud je z jednoho rodokmenu vybráno více trií. Vzhledem k tomu, že všechny předchozí analýzy byly prováděny s mikrosatelitními markery, pokračovali jsme i při analýze trií touto technologií. Avšak jednotlivé alely jsou méně stabilní, a tak v některých rodinách může genetická determinanta onemocnění být asociována s různými alelami, a naopak – stejná alela v jedné rodině může být s vyvolávajícím genem asociována a v jiné rodině stejná alela nikoliv. Proto byly vytvářeny haplotypy ze sousedních markerů, které jsou v jednotlivých rodinách specifitější a díky metodě se pozitivní přenos různých haplotypů v rámci stejného markeru sčítá. Ale díky vyššímu počtu různých kombinací alel v páru markerů vytvářejících haplotyp je menší pravděpodobnost, že v jiné rodině by se stejný haplotyp vyskytl bez asociace s genetickou determinantou. Cenou za tuto vyšší specifitčnost je vysoký počet stupňů volnosti v daném testu a tak klesající statistická síla testu. TDT stejně jako ostatní neparametrické testy při své negativitě nevylučuje asociaci a jeho statistická síla u mikrosatelitních markerů nelze a priori určit, jako je tomu u jednonukleotidových markerů.

Hodnocení v rámci trií pomocí TDT v oblasti *RLS2* na chromozomu 14 zachytilo signifikantní asociaci s haplotypem, který se skládal z markerů vyskytujících se v regionu maximálního LOD skóre, který byl popsán při první publikaci tohoto lokusu (Bonati et al., 2003). V této práci hodnoty vícebodového LOD vyšší než 2 byly nalezeny mezi markery

D14S70 až D14S1068, což odpovídá pozici 40–49cM na chromozomu 14. Maximální hodnoty byly nalezeny s D14S288 o hodnotě LOD 3,23 na pozici 47,51 cM. Pomocí stejného modelu byl tento lokus potvrzen v jedné ze 17 rodin francouzsky mluvících Kanadčanů (Levchenko et al., 2004). Náš výsledek představuje první potvrzení tohoto lokusu v evropské populaci. Ze tří genů, které by mohly být asociovány v RLS v této oblasti, je nejslibnější GARN1, což je neuronální transkripční faktor interagující s GTPásami. V oblasti lokusu *RLS3* na chromozomu 9 nebyla v rámci všech rodin nalezena signifikantní asociace, ale četné sugestivní asociace v rodinách jihoevropského původu a signifikantní asociace v rodinách střeoevropského původu naznačuje pravděpodobnou výraznou geotnickou variabilitu v tomto lokusu, jeho vliv pouze v některých populacích. Toto pozorování nadále podporuje názor, že RLS je geneticky heterogenní. Nejsilnější asociace byla nalezena u střeoevropských rodin v genetické oblasti, která sice pouze těsně sousedí s oblastí maximálního LOD skóre popsaného při prvním záchytu tohoto lokusu v texaských rodinách (Chen et al., 2004), ale nepřekrývá se s ní. V této práci neparametrická vazba byla nejvyšší s markerem D9S286 o výši $NPL=3,22$, což je hodnota obecně považovaná za nízkou. Ve dvou vybraných rodinách pomocí parametrických vazebných studií byla nalezena signifikantní hodnota dvoubodové LOD skóre s nulovou rekombinační frakcí o hodnotách při součtu obou rodin 3,77 s markerem D9S286 na pozici 18,0,6 cM a o hodnotě 3,2 s markerem D9S274 na pozici 27,8 cM. Vícebodové LOD skóre dosáhlo maxima mezi sousedícími markery D9S2169 a D9S286 o hodnotě 3,9. Naše oblast obsahuje mimo jiné i kandidátní gen *SH3GL2*, který se rovněž účastní na procesech exocytosis neuromediátorů. V nově objevené oblasti na chromozomu 4 v bavorské rodině byla nalezena signifikantní asociace podobně jako v případě *RLS3* pouze v jednotlivých subpopulacích a tyto oblasti se nepřekrývají v oblasti popsané pomocí vazebné analýzy a pouze spolu sousedí. V oblastech zjištěných pomocí TDT nejsou přítomny žádné potenciální kandidátní geny. V oblasti chromozomu 17 byla nalezena signifikantní asociace s markerem v celé sadě rodin. Tato oblast sousedí s výslednou oblastí z vazebné analýzy. Další signifikantní asociace v rámci trií byla nalezena s haplotypem, který se překrývá s maximem LOD skóre z vazebné analýzy a potvrzuje tak tento výsledek. V oblasti tohoto překryvu se vyskytují tři kandidátní geny, z nichž nadějným by mohl být např. gen pro vaniloidní receptor nebo ubiquitin. Na chromozomu 19 byla v rámci všech rodin prokázána signifikantní asociace s haplotypem, který leží v oblasti pozitivního výsledku vazebné analýzy. Tato oblast obsahuje čtyři kandidátní geny, z nich *Rab3a*, který se účastní exocytosis neurotransmiterů a *KCNN1*, což je pomalý kaliový kanál. Tyto dva geny byly sekvenovány u členů rodiny italského původu, ve které byla vazba s touto oblastí nalezena, avšak bez nálezu mutace. Další signifikantní asociace nalezená u rodin střeoevropského původu je v haplotypu, který se s oblastí nalezenou vazebnou analýzou nepřekrývá.

Závěrečný souhrn

1. Klinická část práce potvrzuje jako hlavní znak familiárního RLS nižší věk při nástupu obtíží a malé procento sekundárních RLS ve smyslu sideropenické anemie či neuropatie. Naše studie však naznačuje potenciální účast erythropoetinu v patogenezi RLS.
2. Genetická část studie jako součást projektu s 11 rodinami českého původu ze studie EU-RLS-GENE potvrdila neúčinnost parametrických vazebných studií při pokusu o nezávislé potvrzení dříve popsaných lokusů v rámci onemocnění a prakticky vyloučila vazbu za předpokladu autosomálně dominantního modelu v těchto rodinách v rozsahu dosud v literatuře popsaných lokusů.
3. Bylo provedeno vyšetření celého genomu u čtyř rodin ze studie EU-RLS-GENE, které u jedné z nich prokázalo nový lokus na chromozomu 19.
4. Byla použita moderní metoda z okruhu asociačních studií v rámci rodin, díky níž byly potvrzeny oblasti na chromozomu 12, 14 a 17. Dále tato práce pomohla potvrdit nově identifikovaný lokus na chromozomu 19. Tyto výsledky rovněž zúžily popsané oblasti a pomáhají tak zaměřit se důkladněji na kratší segmenty chromozomů, což umožňuje v budoucnu podrobnější analýzu.

Literatura:

- Abecasis GR, Cherny SS, Cookson WO, Cardon LR, 2002. Merlin--rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees. *Nat Genet* 30:97-101.
- Allen RP, Early CJ, 2001. Restless legs syndrome: A review of clinical and pathophysiological features. *J Clin Neurophysiol* 18:128–147.
- Allen RP, Picchiatti D, Hening WA, Trenkwalder C, Walters AS, Montplaisir J, 2003. Restless Legs Syndrome Diagnosis and Epidemiology workshop at the National Institutes of Health; International Restless Legs Syndrome Study Group, Restless legs syndrome, diagnostic criteria, special considerations, and epidemiology. A report from the restless legs syndrome diagnosis and epidemiology workshop at the National Institutes of Health. *Sleep Med* 4:101–119.
- Allen RP, Walters AS, Montplaisir J, Hening W, Myers A, Bell TJ, Ferini-Strambi L, 2005. Restless legs syndrome prevalence and impact: REST general population study. *Arch Intern Med* 165: 1286–1292.
- Barrière G, Cazalets JR, Bioulac B, Tison F, Ghorayeb I, 2005. The resltes legs syndrome. *Progress Neurobiol* 77:139–165.
- Berger K, Luedemann J, Trenkwalder C, John, U., Kessler, C, 2004. Sex and the risk of restless legs syndrome in the general population. *Arch Intern Med* 164:196–202.
- Bonati MT, Ferini-Strambi L, Aridon P, Oldani A, Zucconi M, Casari G, 2003. Autosomal dominant restless legs syndrome maps on chromosome 14q. *Brain* 126:1485–92.
- Broman KW, Murray JC, Sheffield VC, 1998. Comprehensive human genetic maps: Individual and sex-specific variation in recombination. *Am J Hum Genet* 63:861–689.

Coleman R, Periodic movements in sleep (nocturnal myoclonus) and restless legs syndrome. In: *Sleeping and waking disorders: indications and techniques*. Guillemainault C (eds), Addison-Wesley, Menlo Park, CA, 1982, pp. 265–295.

Daly MJ, Kruglyak L, Pratt SC, 1998. GENEHUNTER 2.0—a complete linkage analysis system. *Am J Hum Genet* 63 (Genet Suppl): A286

Desautels A, Turecki G, Montplaisir J, Brisebois K, Sequeira A, Adam B, 2002. Evidence for a genetic association between monoamine oxidase A and restless legs syndrome. *Neurology* 59:215–219.

Desautels A, Turecki G, Montplaisir J, Sequeira A, Verner A, Rouleau GA, 2001. Identification of a major susceptibility locus for restless legs syndrome on chromosome 12 q. *Am J Hum Genet* 69:1266–70.

Desautels A, Turecki G, Montplaisir J, Xiong L, Walters AS, Ehrenberg BL, Brisebois K, Desautels AK, Gingras Y, Johnson WG, Lugaresi E, Coccagna G, Picchiatti DL, Lazzarini A, Rouleau GA, 2005. Restless legs syndrome: confirmation of linkage to chromosome 12q, genetic heterogeneity, and evidence of complexity. *Arch Neurol* 62:591–6.

Dudbridge F, 2003. Pedigree disequilibrium tests for multilocus haplotypes. *Genet Epidemiol* 25:115–21

Earley CJ, Connor JR, Beard JL, 2000. Abnormalities in CSF concentrations of ferritin and transferrin in restless legs syndrome. *Neurology* 54:1698-1700

Hening W, 2004. The clinical neurophysiology of the restless legs syndrome and periodic limb movements. Part I. diagnosis, assessment, and characterization. *Clin Neurophysiol* 115: 1965–1974.

Hicks AA, Rye DB, Kristjansson, Sigmundsson T, Sigurdsson AP, Eirikdottir I, 2005. Population-based confirmation of the 12q RLS locus in Iceland [abstract]. *Mov Disord* 20 (suppl 10):P117

Hogl B, Kiechl S, Willeit J, Saletu M, Frauscher B, Seppi K, Muller J, Rungger G, Gasperi A, Wenning G, Poewe W, 2005. Restless legs syndrome: a community-based study of prevalence, severity, and risk factors. *Neurology* 64:1920–4

Chabli A, Michaud M, Montplaisir J, 2000. Periodic arm movements in patients with the restless legs syndrome. *Eur Neurol* 44: 133–138.

Chen S, Ondo WG, Rao S, 2004. Genomewide linkage scan identifies a novel susceptibility locus for restless legs syndrome on chromosome 9p. *Am J Hum Genet* 74:876–85.

International Human Genome Sequencing Consortium, 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860–921

Kemlink D, Šonka K, Nevšimalová S, Pretl M, Benáková M, Zima T, Pantelakis L, Serranová T, 2003. Rodinné a sporadické formy syndromu neklidných nohou. *Ces a Slov Neurol Neurochir* 6:387–91.

Lazzarini A, Walters AS, Hickey K, Coccagna G, Lugaresi E, Ehrenberg BL, Picchiatti DL, Brin MF, Stenroos ES, Verrico T, Johnson WG, 1999. Studies of penetrance and anticipation in five autosomal-dominant restless legs syndrome pedigrees. *Mov Disord* 14: 111–116.

Levchenko A, Montplaisir JY, Dube MP, Riviere JB, St-Onge J, Turecki G, Xiong L, Thibodeau P, Desautels A, Verlaan DJ, Rouleau GA, 2004. The 14q restless legs syndrome locus in the French Canadian population. *Ann Neurol* 55:887–91.

Manconi M, Govoni V, De Vito A, Economou NT, Cesnik E, Casetta I, Mollica G, Ferini-Strambi L, Granieri E, 2004. Restless legs syndrome and pregnancy. *Neurology* 63: 1065–1069.

Michaud M, Dumont M, Selmaoui B, Paquet J, Fantini ML, Montplaisir J, 2004. Circadian rhythm of restless legs syndrome: relationship with biological markers. *Ann Neurol* 55: 372–380.

Michaud M, Chabli A, Lavigne G, Montplaisir J, 2000. Arm restlessness in patients with restless legs syndrome. *Mov Disord* 15: 289–293.

Montplaisir J, Boucher S, Poirier G, Lavigne G, Lapierre O, Lesperance P, 1997. Clinical, polysomnographic, and genetic characteristics of restless legs syndrome: a study of 133 patients diagnosed with new standard criteria. *Mov Disord* 12: 61–65.

Montplaisir J, Michaud M, Denesle R, Gosselin A, 2000. Periodic leg movements are not more prevalent in insomnia or hypersomnia but are specifically associated with sleep disorders involving a dopaminergic impairment. *Sleep Med* 1: 163–167.

O’Keeffe ST, Gavin K, Lavan JN, 1994. Iron status and restless legs syndrome in the elderly. *Age Ageing* 23: 200–203.

Ondo WG, Dat Vuong K, Wang Q, 2000. Restless legs syndrome in monozygotic twins: Clinical correlates. *Neurology* 55:1404–1407

Ondo WG, Vuong KD, Jankovic J, 2002. Exploring the relationship between Parkinson disease and restless legs syndrome. *Arch Neurol* 59: 421–424.

Ott J, 1989. Computer-simulation methods in human linkage analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:4175–4178

Phillips B, Young T, Finn L, Asher K, Hening WA, Purvis C, 2000. Epidemiology of restless legs symptoms in adults. *Arch Int Med* 160:2137–41.

Sham PC a Curtis D, 1995. An extended transmission disequilibrium test (TDT) for multi-allele marker loci. *Ann Hum Genet* 59: 323–36.

Staden R, Judge PD, Bonfield JK. Managing Sequencing Projects in the GAP4 Environment. *Introduction to Bioinformatics. A Theoretical and Practical Approach.* Eds. Stephen A. Krawetz and David D. Womble. Human Press Inc., Totawa, NJ 07512 (2003)

Suzuki K, Ohida T, Sone T, Takemura S, Yokoyama E, Miyake T, Harano S, Motojima S, Suga M, Ibuka E, 2003. The prevalence of restless legs syndrome among pregnant women in Japan and the relationship between restless legs syndrome and sleep problems. *Sleep* 26: 673–677.

Walters AS, 1995. Toward a better definition of restless legs syndrome. The International Restless Legs Syndrome Study Group. *Mov Disord* 10:634–642

Walters AS, Hickey K, Maltzman J, Verrico T, Joseph D, Hening W, Wilson V, Chokroverty S, 1996. A questionnaire study of 138 patients with restless legs syndrome: the “Night-Walkers” survey. *Neurology* 46:92–5.

- Walters AS, LeBrocq C, Dhar A, Hening W, Rosen R, Allen RP, Trenkwalder C. International Restless Legs Syndrome Study Group, 2003. Validation of the International Restless Legs Syndrome Study Group rating scale for restless legs syndrome. *Sleep Med* 4: 121–132.
- Weeks DE, Ott J, Lathrop GM, 1990. SLINK: a general simulation program for linkage analysis. *Am J Hum Genet* 47: A204 (Supplement)
- Wetter TC, Collado-Seidel V, Oertel H, Uhr M, Yassouridis A, Trenkwalder C, 2002. Endocrine rhythms in patients with restless legs syndrome. *J Neurol* 249:146–151.
- Willis T, 1685. *The London practice of physick*. London, England: Basset and Crooke.
- Winkelmann J, Lichtner P, Pütz B, Trenkwalder C, Hauk S, Meitinger T, Strom T, Muller-Myhsok B, 2006. Evidence for further genetic locus heterogeneity and confirmation of RLS1 in Restless legs syndrome. *Mov Disord* 21:28–33.
- Winkelmann J, Muller-Myhsok B, Wittchen HU, Hock B, Prager M, Pfister H, Strohle A, Eiseensehr I, Dichgans M, Gasser T, Trenkwalder C, 2002. Complex segregation analysis of restless legs syndrome provides evidence for an autosomal dominant mode of inheritance in early age at onset families. *Ann Neurol* 52:297–302
- Zhao JH, Sham PC, Curtis D, 1999. A program for the Monte Carlo evaluation of significance of the extended transmission disequilibrium test. *Am J Hum Genet* 64:1484–5.

Vlastní publikace

Originální práce s IF

1. Busek P, Horakova D, Opavsky J, Salinger J, Kemlink D, Slachta R, Havrdova E Heart rate variability in multiple sclerosis: its relation to the activity of the disease *CESKA A SLOVENSKA NEUROLOGIE A NEUROCHIRURGIE* 68 (1): 14-18 2005 IF 0,037
2. Busek P, Kemlink D. The influence of the respiratory cycle on the EEG. *PHYSIOL RES.* 54(3):327-33, 2005. IF 1,14
3. Kemlink D, Sonka K, Nevsimalova S, M, Benáková M, Zima T, Pantelakis L, Serranová T. Familial and sporadic forms of restless legs syndrome. *CESKA A SLOVENSKA NEUROLOGIE A NEUROCHIRURGIE* 66 (6): 387-391 2003 IF 0,037
4. Kemlink D, Jerabkova V, Janku M, Janku M, Krenova D, Kren V PXO set of recombinant inbred strains of the rat: A new strain distribution pattern containing 448 markers *FOLIA BIOLOGICA* 49 (4): 165-176 2003 IF 0,507
5. Sonka K, Kemlink D, Pretl M. Cataplexy treated with escitalopram - clinical experience. *NEURO ENDOCRINOL LETT.* 25;27(1-2):174-176 2006 IF 1,048

Originální práce bez IF

1. Sonka K., Fiksa J, Horváth E, Kemlink D, Süssová J, Böhm J, Šebesta V, Volná J, Nevšimalová S. Sleep and Fasciculations in Amyotrophic Lateral Sclerosis, *SOMNOLOGIE* 8:25-30 2004

2. Kemlink D, Pretl M, Kelemen J, Sonka K, Nevsimalova S. Periodic limb movements in sleep: polysomnographic and actigraphic methods for their detection CAS LEK CESK 144(10):689-691 2005

Abstrakty z konferencí

1. Kemlink D, Pretl M, Kelemen J, Sonka K., Nevsimalova S. A comparison of polysomnographic and actigraphic evaluation of periodic leg movements in sleep 14th Meeting of the European Neurological Society. Barcelona 2004. JOURNAL OF NEUROLOGY 251: 137-137 Suppl. 3 JUN 2004
2. Kemlink D, Šonka K, Nevšimalová S, Pretl M, Benáková M, Zima T, Pantelakis L, Serranová T. Genetic Aspects of the Restless Legs Syndrome - A Genealogical Study. Sixth IBRO World Congress of Neuroscience, Prague 2003, Czech Republic, Abstract book p198.
3. Kemlink D, Šonka K, Nevšimalová S, Pretl M, Benáková M, Zima T, Pantelakis L, Serranová T. Syndrom neklidných nohou - Rodinné a sporadické formy. V. celostátní sjezd - Zdravý spánek v rozvinuté civilizaci - Klinika a výzkum, Hradec Králové 2003, Česká republika abstr p. 12-13.
4. Kemlink D., Pretl M., Kelemen J., Sonka K., Nevsimalova S. A Comparison of Polysomnographic and Actigraphic Evaluation of Periodic Leg Movements in Sleep. 17th ESRS Congress Prague, 2004, Journal of Sleep Research, 13: Suppl. 1, October 2004.
5. Kemlink D, Pretl M, Kelemen J, Sonka K, Nevsimalova S. Actigraphic detection of periodic leg movements: further validation studies. First Congress of World Association of Sleep Medicine, Berlin October 2005.
6. Kemlink D, Hauk S, Meitinger T, Müller-Myhsok B, Winkelmann J, Šonka K, Nevšimalová S. Asociační analýza v rámci rodin evropského původu se syndromem neklidných nohou na chromosomech 9p a 14q. VII. český a II. česko-slovenský sjezd o spánku, 4.-5. listopadu 2005, Brno.
7. Kemlink D, Pretl M, Kelemen J, Sonka K, Nevsimalova S. Srovnání polysomnografického a aktigrafického vyhodnocování periodických pohybů ve spánku. 51. neurofyziologický kongres, 3.-6. 11. 2004, Srní
8. Kemlink D., Šonka K., Nevšimalová S., Winkelmann J., Müller-Myshok B., Högl B. Vazebná analýza kandidátních chromozomálních oblastí u familiárního syndromu neklidných nohou. 19. ČESKÝ A SLOVENSKÝ NEUROLOGICKÝ SJEZD, 12.-4.12.2004, Brno, Sborník abstrakt - Neurologie pro praxi p. 35.

Podané práce dosud nepublikované:

1. Kemlink D, Polo O, Montagna P, Provini F, Stiasny-Kolster K, Oertel K, de Weerd A, Nevsimalova S, Sonka K, Högl B, Frauscher B, Poewe W, Trenkwalder C, Pramstaller PP, Ferini-Strambi L, Zucconi M, Konofal E, Arnulf I, Hadjigeorgiou GM, Happe S, Klein S, Hiller A, Lichtner P, Meitinger T, Müller-Myshok B, Winkelmann J. A Family-based Association Study of the Restless Legs Syndrome Loci 2 and 3 in a European Population - podáno do Movement Disorders.

2. Kemlink D, Pretl M, Sonka K, Nevsimalova S. A Comparison of Polysomnographic and Actigraphic Evaluation of Periodic Limb Movements in Sleep - podáno do Brain Research Bulletin.
3. Winkelmann J, Lichtner P, Kemlink D, Polo O, Montagna P, Högl P, Stiasny-Kolster K, Hadjigeorgiou GM, Pütz B, Trenkwalder C, Strom TM, Meitinger T, Müller-Myhsok B. New Loci for Restless Legs Syndrome map to Chromosome 4q and 17p – podáno do Journal of European Neurology.