

# TESIS DOCTORAL

ESPECTRO CLÍNICO Y GENÉTICO DE LAS NEUROPATÍAS  
HEREDITARIAS MOTORAS DISTALES EN LA COMUNIDAD  
VALENCIANA



VNIVERSITAT D VALÈNCIA

**Programa de Doctorado 3139 Medicina**

**Departamento de Medicina. Facultad de Medicina**

**JULIO 2021**

PRESENTADA POR: MARINA FRASQUET CARRERA

DIRIGIDA POR: TERESA SEVILLA MANTECÓN



## **AGRADECIMIENTOS**

A Teresa Sevilla, por todas sus enseñanzas y la confianza depositada en mí. Por su constante dedicación y esfuerzo para que este trabajo saliera adelante.

A Vincenzo Lupo, por su inestimable ayuda, por su paciencia y horas extras dedicadas a este proyecto.

A los compañeros de la Unidad de Enfermedades Neuromusculares de La Fe, del grupo de Investigación en Patología Neuromuscular y Ataxias del IIS La Fe y al equipo del CIPF. Este trabajo ha sido posible gracias a ideas, proyectos y esfuerzos previos de todos ellos.

A los compañeros de Neurología y Neurofisiología de la Fe, por su ayuda.

A los pacientes, verdaderos protagonistas de este trabajo, por su tiempo y constante disposición a colaborar.

A mis padres, por todas las oportunidades que me han regalado.

A David, por su apoyo incondicional...y por hacerme feliz.

A Pau, mi fuente de motivación y alegría.



# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
Las Neuropatías hereditarias motoras distales.....	3
NHMD como enfermedad de la neurona motora. Solapamiento con otras enfermedades neurodegenerativas .....	5
Clasificación de las NHMD: perspectiva histórica.....	7
El diagnóstico de las NHMD.....	13
<i>Los estudios electrofisiológicos</i> .....	13
<i>Resonancia magnética muscular</i> .....	14
<i>Los estudios genéticos</i> .....	16
El rendimiento diagnóstico de las NHMD.....	18
Patomecanismos de las NHMD .....	19
Genes implicados en las NHMD.....	21
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>51</b>
<b>HIPÓTESIS DE TRABAJO</b> .....	<b>55</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>59</b>
Objetivo general.....	61
Objetivos específicos.....	61
<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>63</b>
Población.....	65
Selección de variables clínicas.....	65
Estudios genéticos.....	66
Aspectos éticos.....	67
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>69</b>
Artículo 1: Distal hereditary motor neuropathies: Mutation spectrum and genotype-phenotype correlation.....	71
Artículo 2: Clinical spectrum of <i>BICD2</i> mutations .....	75
Artículo 3: Phenotype and natural history of inherited neuropathies caused by HSJ1 c.352+1G>A mutation .....	79
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>83</b>
En castellano .....	85
En inglés .....	87
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>89</b>
<b>ANEXO: TRABAJOS PUBLICADOS</b> .....	<b>109</b>
Artículo 1 .....	111
Artículo 2 .....	163
Artículo 3 .....	193



## **ABREVIATURAS**

AD: autosómico dominante

AME: atrofia muscular espinal

AR: autosómico recesivo

CMAP: potencial de acción motor compuesto

CMT: Charcot-Marie-Tooth

CMT2: Charcot-Marie-Tooth tipo 2/Charcot Marie-Tooth axonal

CVF: capacidad vital forzada

dHMN: distal hereditary motor neuropathies

ECN: estudios de conducción nerviosa

EMG: electromiografía

HUiP La Fe: Hospital Universitari i Politènic la Fe

NHMD: neuropatía hereditaria motora distal

PEH: paraparesia espástica hereditaria

PSE: potencial sensitivo evocado

PUM: potencial de unidad motora

SMALED: Spinal muscular atrophy, lower extremity predominant

SNC: sistema nervioso central

SNV: Single Nucleotide Variant/variante de nucleótido único

tRNA: ARN de transferencia

UNM: unión neuromuscular

RM: resonancia magnética

VCM: velocidad de conducción motora

VUS: variant of uncertain significance/ variante de significado incierto



## LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Clasificación de las NHMd/AED por A.E Harding .....	8
Tabla 2. Genes causantes de NHMd, herencia y fenotipo asociado.....	9
Figura 1. Imagen de paciente afecto de NHMd.....	3
Figura 2. Clasificación de las neuropatías tipo CMT .....	4
Figura 3. Solapamiento clínico y genético entre las NHMd y otras enfermedades neurodegenerativas.....	6
Figura 4. Paciente afecto de NHMd de predominio en miembros superiores. ....	7
Figura 5. RM muscular a nivel de piernas de un sujeto asintomático .....	15
Figura 6. RM muscular a nivel de piernas y pies de un paciente afecto de NHMd por mutación en el gen <i>HSPB1</i> .....	15
Figura 7. RM muscular a nivel de muslos y piernas de un paciente afecto de NHMd/SMALED por mutación en el gen <i>DYNC1H1</i> . ....	15
Figura 8. Patomecanismos implicados en las NHMd.....	20



# **INTRODUCCIÓN**



## Las Neuropatías hereditarias motoras distales

Las neuropatías hereditarias motoras distales (NHMd), también conocidas como atrofas espinales distales (AED), son un grupo de enfermedades que se caracterizan por una afectación exclusiva de la parte motora de los nervios periféricos (Harding and Thomas, 1980; Sevilla, 1996; Rossor *et al.*, 2012). Se engloban dentro de un grupo más amplio de neuropatías hereditarias llamadas neuropatías tipo Charcot-Marie-Tooth (CMT) (Reilly *et al.*, 2011).

El cuadro clásico de las NHMd se caracteriza por una debilidad y atrofia de la musculatura distal de extremidades, simétrica, más frecuentemente afectando a las extremidades inferiores y que suele asociar deformidad de pies (Harding and Thomas, 1980; Rossor *et al.*, 2012). En la mayoría de los casos el inicio de los síntomas es en las dos primeras décadas de vida (Harding and Thomas, 1980) y el curso lentamente progresivo, aunque es muy variable abarcando desde formas congénitas sin apenas progresión (Rossor *et al.*, 2015b) a otras que progresan a músculos proximales y producen una discapacidad grave (Bertini *et al.*, 1989; Blumen *et al.*, 2012).

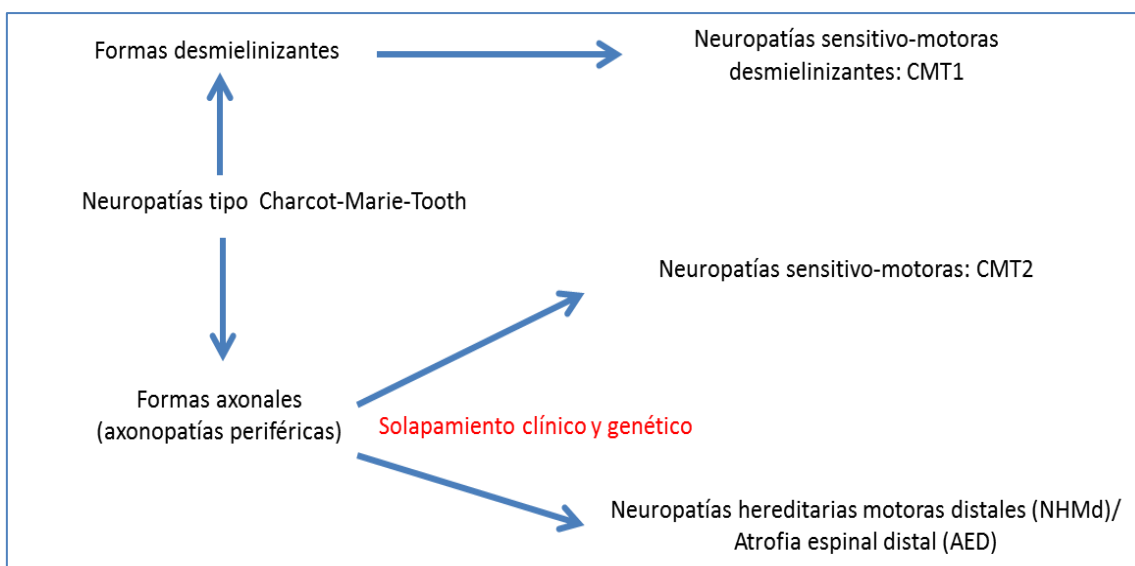
Las NHMd son enfermedades de causa genética. Se han identificado más de 30 genes relacionados con las NHMd (<http://neuromuscular.wustl.edu/>), sin embargo a pesar de los avances en los estudios genéticos, hoy en día solo el 15-32,5% de los pacientes afectados de NHMd se consiguen caracterizar genéticamente (Dierick *et al.*, 2008; Saporta *et al.*, 2011; Murphy *et al.*, 2012; Fridman *et al.*, 2015, Rossor *et al.*, 2015a; Bansagi *et al.*, 2017). Las NHMd se consideran “enfermedades raras” (ORPHA: 53739) aunque su prevalencia no se conoce con exactitud. En su conjunto, las neuropatías hereditarias tipo CMT tienen una prevalencia estimada de 11-30/100.000 (Combarros *et al.*, 1987; Foley *et al.*, 2012; Müller *et al.*, 2021). Harding y Thomas calcularon que la frecuencia relativa de las NHMd dentro de las neuropatías hereditarias tipo CMT era del 13%



**Figura 1.** Paciente de 28 años afecto de NHMd. Se observa atrofia de musculatura de piernas.

(Harding and Thomas, 1980), una cifra muy similar a la calculada en la serie de neuropatías tipo CMT del Hospital Universitario La Fe, en Valencia, en el año 1996, donde el porcentaje de NHMd dentro del conjunto del síndrome de CMT fue del 12.5% (n=28/228) (Sevilla, 1996). Más recientemente, se ha calculado una prevalencia mínima de las NHMd en el Norte de Inglaterra de 2,14 por 100.000 habitantes (Bansagi *et al.*, 2017).

Las NHMd se diferencian de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT) en que en ésta última existe afectación sensitiva además de motora. En cualquier caso, entre ambas entidades existe un solapamiento clínico y genético, ya que mutaciones en un mismo gen pueden expresarse tanto como CMT axonal (CMT2) como NHMd (Rossor *et al.*, 2012), y algunos pacientes con CMT2 apenas presentan clínica sensitiva y son indistinguibles de una NHMd desde un punto de vista clínico (Harding, 2005). Los límites entre NHMd y CMT2, por tanto, en ocasiones pueden ser difíciles de definir.



**Figura 2.** Mediante el estudio electrofisiológico clasificamos las neuropatías tipo CMT en formas desmielinizantes (CMT tipo 1) que son aquellas en las que la velocidad de conducción motora (VCM) en miembro superior es <38m/s; y por otro, las formas axonales (axonopatías periféricas), en las que la VCM >38 m/s. Dentro de las formas axonales distinguimos las formas sensitivo-motoras, que se clasifican como CMT tipo 2 (CMT2), y las formas motoras puras llamadas Neuropatías Hereditarias Motoras distales (NHMd) o Atrofia Espinal Distal (AED). Entre ambos grupos de axonopatías existe un solapamiento tanto clínico como genético.

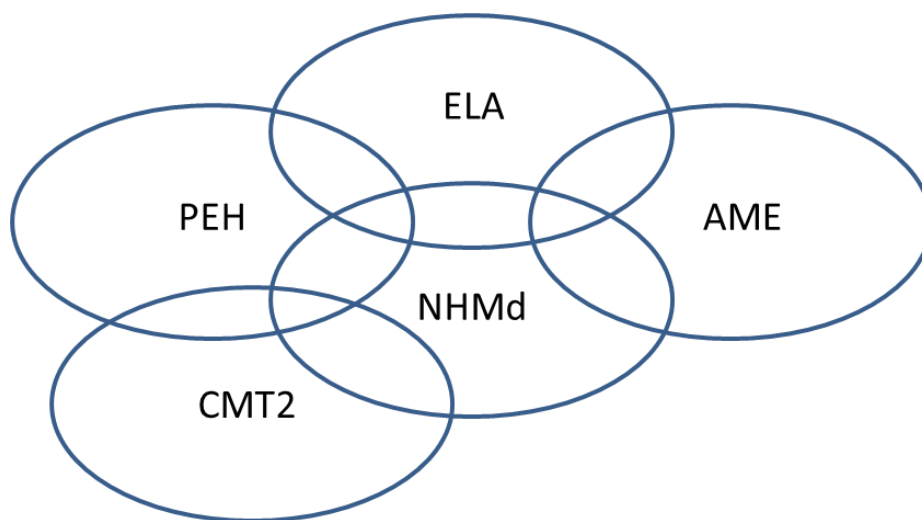
## NHMd como enfermedad de la neurona motora. Solapamiento con otras enfermedades neurodegenerativas

Las NHMd son las formas motoras del CMT. Sin embargo, en algunos casos son consideradas como neuronopatías (afectación del cuerpo de la neurona motora) en lugar de neuropatías (afectación de los axones de las neuronas) ante la creencia de algunos autores de que el proceso patológico primario se encuentra en cuerpo neuronal de la neurona motora del asta anterior de la médula espinal (Dyck and Lambert, 1968), de hecho en algunas publicaciones clásicas, las NHMd se describen dentro del grupo de las “enfermedades de la motoneurona inferior hereditarias” (Harding, 2005). Lo cierto es que en los últimos años, a medida que se han ido identificando los diferentes genes implicados en las NHMd, se ha comprobado que éstos codifican proteínas implicadas en muy variadas funciones en las neuronas motoras y sus axones (Drew *et al.*, 2011; Rossor *et al.*, 2016). También se ha podido comprobar que, efectivamente, existe un solapamiento clínico y genético entre las NHMd y otras enfermedades de la neurona motora como las Atrófias Musculares Espinales (AME) y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), así como entre el CMT/NHMd y las axonopatías centrales/paraparesia espásticas hereditarias (PEH). En concreto:

- NHMd y AME: La AME se caracterizan por una pérdida o desarrollo anormal de las motoneuronas inferiores con un patrón no longitud dependiente. Las mutaciones en algunos genes como *IGHMBP2* o *TRPV4*, pueden dar lugar tanto a fenotipos tipo AME con debilidad de predominio proximal en extremidades como fenotipos de NHMd (Grohmann *et al.*, 2001a; Zimoń *et al.*, 2010; Cottenie *et al.*, 2014). Por otro lado, las mutaciones en algunos genes como *DYNC1H1* o *BICD2* dan lugar fenotipos que están a caballo entre una AME y NHMd, ya que los pacientes pueden presentar debilidad y atrofia de musculatura proximal y/o distal de miembros inferiores, y es frecuente que asocien deformidad de pies (Rossor *et al.*, 2015b).
- NHMd y ELA: Existen algunas formas de NHMd, como las asociadas al gen *VRK1*, en las que los pacientes presentan afectación de primera motoneurona en forma de hiperreflexia o tiempo de conducción motora central alargado (Stoll *et al.*, 2016). Las mutaciones en heterocigosis en el gen *SETX* causan “NHMd

con signos de motoneurona superior” y ELA de inicio juvenil (ELA tipo 4) (Chen *et al.*, 2004).

- NHMd y PEH: las PEH son un grupo de enfermedades genéticas que se caracterizan por una degeneración progresiva de los axones del tracto corticoespinal, lo que da lugar a una debilidad y espasticidad progresiva en las extremidades inferiores (Reid, 2003). En las neuropatías tipo CMT se afectan los nervios periféricos y en las PEH los axones del sistema nervioso central (primera motoneurona). La fisiopatología molecular de las neuropatías tipo CMT y las PEH se solapa a varios niveles. En primer lugar, mutaciones en un mismo gen pueden ser responsables bien de un fenotipo CMT, bien de un fenotipo tipo PEH o bien de un fenotipo combinado. En segundo lugar, muchos de los genes implicados en CMT y PEH están implicados en los mismos procesos celulares tales como mielinización, transporte de membrana, transporte axonal, organización del citoesqueleto y función mitocondrial (Timmerman *et al.*, 2013).



**Figura 3.** Existe un solapamiento clínico y genético entre las neuropatías hereditarias motoras distales (NHMd) y CMT axonal (CMT2) y las paraparesias espásticas hereditarias (PEH). A su vez existe solapamiento entre las NHMd y la atrofia muscular espinal (AME) y la ELA.



## Clasificación de las NHMd: perspectiva histórica

Además de la forma clásica que cursa con debilidad y atrofia muscular de predominio en miembros inferiores, en ocasiones las NHMd se presentan con características clínicas adicionales, como por ejemplo: inicio y predominio en manos (Gross *et al.*, 1998), paresia de cuerdas vocales (McEntagart *et al.*, 2001), parálisis diafragmática (Grohmann *et al.*, 1999) y piramidalismo (De Jonghe *et al.*, 2002).

En 1993, Harding propuso una clasificación de las NHMd basado en el modo de herencia, edad de inicio, topografía de la debilidad y signos clínicos asociados. De esta manera dividió las NHM distales en siete subtipos (NHMd I a VII) (Harding, 2005). Los subtipos I, II, V y VII son de herencia AD y los subtipos III, IV y VI son AR. Los subtipos I y II son “NHMd típicas” de inicio en miembros inferiores y debut en la infancia o en edad adulta respectivamente. El tipo V se caracteriza por inicio en miembros superiores y el tipo VII por presencia de paresia de cuerdas vocales. En cuanto a las formas AR, la III y IV corresponden a formas juveniles leves y graves respectivamente y la VI es una forma grave que debuta en la infancia y asocia insuficiencia respiratoria por afectación diafragmática (Bertini *et al.*, 1989).



Figura 4. Paciente afecto de NHMd de predominio en miembros superiores (tipo V) por mutación en el gen *GARS1*.

**Tabla 1. Clasificación de las NHMd/AED por A.E Harding (modificado de Harding, 2005)**

Tipo	Herencia	Edad de inicio (años)	Pérdida de ambulaci3n (edad en a3os)	Esperanza de vida
I: Inicio juvenil	AD	2-20	Poco frecuente	Normal
II: inicio en edad adulta	AD	20-40	Poco frecuente	Normal
III: Juvenil leve	AR	2-10	Poco frecuente	Normal
IV: Juvenil grave	AR	4 meses-20 a3os	Alrededor de 30	?
V: Predominio en miembros superiores	AD (algunos casos esporádicos)	5-20	No	Normal
VI: Infantil grave	AR	Infantil	No llegan a caminar	<1
VII: asociada a parálisis de cuerdas vocales	AD	10-20	Poco frecuente	Probablemente normal

A medida que se han descrito nuevos tipos de NHMd se han ido a3adido varios subtipos adicionales a la clasificaci3n inicial, como por ejemplo “NHMd con piramidalismo”, “NHMd ligada al X” o “AED congénita” (Rossor *et al.*, 2012). Así mismo, la identificaci3n progresiva de genes responsables de NHMd ha demostrado que esta heterogeneidad clínic responde a una heterogeneidad genética, incluso en fenotipos aparentemente homogéneos existe heterogeneidad genética, habiéndose hallado hasta la fecha mutaciones en más de 30 genes. No hay un subtipo claramente predominante sobre el resto y las características fenotípicas en la mayoría de las veces son poco orientativas para el diagnóstico genético (Rossor *et al.*, 2012).

**Tabla 2. Genes causantes de NHMd, herencia y fenotipo asociado.**

Gen	Herencia	Fenotipo
<i>AARS1</i>	AD	NHMd clásica
<i>AIFM1</i>	Ligada al X recesiva	NHMd de inicio temprano progresiva.  *Síndrome de Cowchock, encefalomiopatía mitocondrial, sordera
<i>ATP7A</i>	Ligada al X recesiva	NHMd clásica. En algunos pacientes: disautonomía, afectación sensitiva leve.  *Síndrome de Menkes, Síndrome del cuerno occipital.
<i>BICD2</i>	AD	SMALED  NHMd
<i>BSCL2</i>	AD	NHMd de predominio en manos (NHMd –V)  NHMd clásica  Síndrome de Silver: paraparesia espástica y atrofia en manos  *Lipodistrofia congénita de Berardinelli-Seip (herencia AR)
<i>CHCHD10</i>	AD	Lower motor neuron syndrome with late-adult onset (LOSMoN) Atrofia muscular espinal tipo Jokela (SMAJ)
<i>DCTN1</i>	AD	NHMd-VIIB (NHMd de predominio en manos con parálisis de cuerda vocal)  *Síndrome de Perry (AD).
<i>DNAJB2</i>	AR	NHMd con curso progresivo y afectación posterior de musculatura proximal y bulbar. La afectación sensitiva aparece a medida que la enfermedad evoluciona.  Parkinsonismo. Signos piramidales.
<i>DYNC1H1</i>	AD	SMALED  Puede asociar afectación del SNC

INTRODUCCIÓN

<i>FBXO38</i>	AD	NHMD “de predominio en pantorillas” ( <i>distal SMA with calf predominance</i> )
	AR	NHMD congénita con patrón clásico y asociada a hipoacusia y malformaciones orgánicas.
<i>FBLN5</i>	AD	NHMD con hiperelasticidad cutánea, hiperlaxitud de articulaciones y degeneración macular asociada a la edad.
<i>GARS1</i>	AD	NHMD de predominio en manos (NHMD-V)  CMT2D
<i>HARS1</i>	AD	NHMD  CMT2, CMT2 de predominio motor, CMT desmielinizante o intermedio (AD)
<i>HINT1</i>	AR	NHMD con neuromiotonía  CMT2 de predominio motor con neuromiotonía
<i>HSPB1</i>	AD ( y AR)	NHMD clásica de inicio en adultos  “Neuromiopatía” con cifras elevadas de CKs (>1000 U/L) y vacuolas en biopsia muscular.
<i>HSPB3</i>	AD	NHMD clásica de inicio a los 20-30 años.  CMT2
<i>HSPB8</i>	AD	NHMD clásica de inicio en adultos jóvenes.  CMT2, miopatía miofibrilar.
<i>IGHMBP2</i>	AR	Atrofia muscular espinal con distress respiratorio tipo 1 (Spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1 - SMARD1)  dHMN y CMT2 de inicio en la infancia y sin afectación respiratoria
<i>LAS1L</i>	Ligada al X	Atrofia muscular espinal con distress respiratorio tipo 2 (SMARD2)

<i>MME</i>	AR	NHMd de inicio tardío  Otros: CMT2 de predominio motor
<i>MYH14</i>	AD	NHMd clásica (+/- miopatía distal) de inicio en infancia-juventud asociada a sordera y "voz ronca".  *Sordera neurosensorial de herencia AD
<i>PLEKHG5</i>	AR	NMH de curso progresivo y grave. Inicio en la infancia.  CMT desmielinizante
<i>REEP1</i>	AD	NHMd clásica NHMd de predominio en manos (NHMd -V) * Neuropatía axonal congénita grave, asociada a artrogriposis y distrés respiratorio (herencia AR)
<i>SETX</i>	AD	NHMd con signos de motoneurona superior / ELA de inicio juvenil (ELA tipo 4) *Ataxia con apraxia oculomotora tipo 2 (herencia AR).
<i>SIGMAR1</i>	AR	NHMd con piramidalismo; NHMd <i>tipo Jerash</i> *ELA-demencia frontotemporal (herencia AR)
<i>SLC25A21</i>	AR	NHMd de inicio en la infancia y curso progresivo-grave. Reflejos vivos y rasgos mitocondriales en la biopsia muscular. *Sinpolidactilia (AD).
<i>SLC5A7</i>	AD	NHMd con paresia de cuerdas vocales (NHMd-VII). *Síndrome miasténico congénito (herencia AR).
<i>SLC12A6</i>	AD	NHMd de inicio en edad temprana con progresión rápida a musculatura proximal. Alteración sensitiva en ENG que progresa con el tiempo.  *Agenesia del cuerpo calloso con neuropatía periférica, OMIM #218000 (herencia AR).
<i>SORD</i>	AR	NHMd con fenotipo clásico.  CMT2 y CMT intermedio

## INTRODUCCIÓN

<i>SPTAN1</i>	AD	NHMD clásica poco progresiva  *Encefalopatías infantiles, encefalopatía epiléptica (mutaciones <i>de novo</i> ). Paraparesia espástica hereditaria (AR).
<i>SYT2</i>	AD	NHMD con afectación presináptica de la unión neuromuscular.
<i>TRPV4</i>	AD	NHMD con paresia de cuerdas vocales  Otros: CMT2C Atrofia muscular espinal escapuloperoneal Atrofia muscular espinal congénita con artrogriposis
<i>VRK1</i>	AR	NHMD clásica, NHMD con piramidalismo.  *Atrofia muscular espinal asociada a hipoplasia pontocerebelosa (AR)
<i>VWA1</i>	AR	NMH con patrón no longitud-dependiente.
<i>WARS</i>	AD	NHMD clásica

\*Indica otros fenotipos, diferentes a neuropatías del grupo CMT, que se han relacionado con el mismo gen, en ocasiones con modo de herencia diferente al de la NHMD asociada al mismo gen.

## El diagnóstico de las NHMd

El primer escalón para el diagnóstico de los pacientes afectados de NHMd se basa en una valoración clínica cuidadosa y el estudio electrofisiológico. El cuadro típico consiste en un paciente que presenta una polineuropatía motora longitud-dependiente de inicio en las primeras décadas de vida, curso lentamente progresivo y que frecuentemente se asocia a deformidad de pies. Las formas de NHMd atípicas que no siguen este patrón pueden ser difíciles de identificar y en ocasiones los pacientes son diagnosticados de polineuropatía adquirida u otros síndromes neurológicos. El estudio del árbol familiar y la identificación del patrón de herencia es clave para el diagnóstico. En ocasiones hay otros familiares afectados o existe consanguinidad en la familia, aunque una proporción importante de casos son aparentemente esporádicos sin una historia familiar obvia (Harding and Thomas, 1980). Ante un caso esporádico hay que tener en cuenta que en los países de la cuenca mediterránea y en ciertas etnias la herencia autosómico recesiva puede llegar hasta un 30-50% de todos los casos (Martin *et al.*, 1999). Como ejemplo de ello, en la serie de CMT del Hospital Universitari i Politècnic La Fe (HUIP La Fe) (Sivera *et al.*, 2013) la herencia autosómico recesiva fue del 11,6%. Por último, hay que considerar que en las familias pequeñas el modo de herencia puede ser difícil de determinar y que también que existe la posibilidad de que la mutación patológica haya ocurrido *de novo* (Rossor *et al.*, 2012)

## Los estudios electrofisiológicos

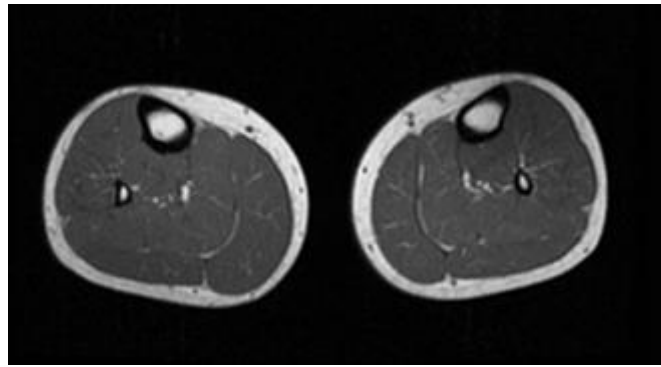
Tanto el estudio de conducciones nerviosas (ECN) como el electromiograma (EMG), son fundamentales en el diagnóstico de las NHMd. En las NHMd los estudios de conducción sensitiva son normales y las amplitudes de los potenciales de acción motor (CMAP) normalmente están reducidas. Las velocidades de conducción motora (VCM) están en rango normal, aunque pueden estar levemente reducidas, sobre todo en los casos en los que existe atrofia grave, debido a la pérdida de los axones motores de mayor diámetro. El EMG normalmente muestra potenciales de unidad motora (PUM)

de amplitud aumentada y duración normal o aumentada sugestivos de un proceso de denervación crónico. En algunos casos, puede haber presencia de actividad espontánea (fibrilaciones y ondas agudas) (Harding, 2005). Como se ha comentado previamente, los estudios electrofisiológicos son útiles para diferenciar entre CMT2 y NHMd, según la presencia o no de alteraciones sensitivas. Así mismo, el EMG es de utilidad en la distinción entre las NHMd y las miopatías distales ya que el cuadro clínico en ambos casos puede ser muy parecido ya que las miopatías distales causan debilidad y atrofia distal de extremidades (Udd, 2014). Sin embargo, en las NHMd el EMG muestra cambios sugestivos de denervación crónica y en las miopatías distales el EMG muestra “cambios miopáticos,” con PUM de corta duración, pequeños y polifásicos (Gutierrez-Rivas *et al.*, 2021).

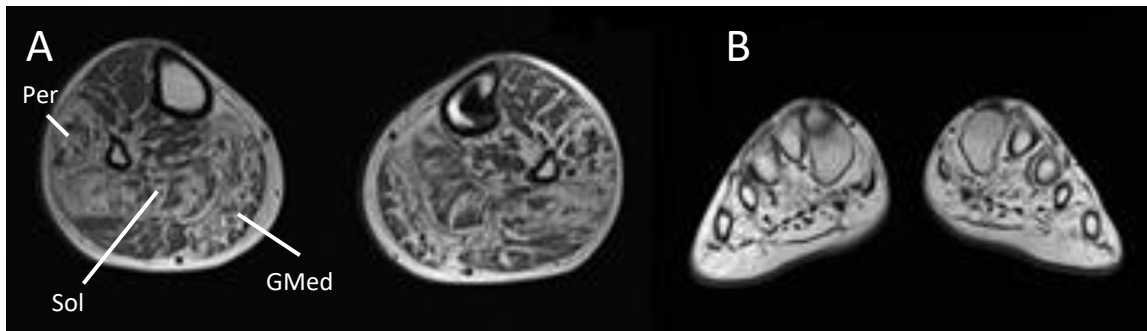
### **Resonancia magnética (RM) muscular**

Otra herramienta diagnóstica de uso relativamente reciente en las NHMd es la RM muscular, ya que es un método ideal para identificar áreas de atrofia muscular e infiltración grasa (Mercuri *et al.*, 2007). Su empleo en la evaluación de pacientes con neuropatías genéticas cada vez es más extendido, ya que permite identificar patrones de afectación muscular que pueden orientar en el diagnóstico molecular de dichas entidades (Chung *et al.*, 2008) (Rossor *et al.*, 2015b). Las secuencias más comúnmente utilizadas son las T1 transversales. Para cuantificar el grado de infiltración grasa de los músculos una de las escalas más utilizada es la de Mercuri modificada por Fischer *et al.* en 2008 (Fischer *et al.*, 2008) que da una puntuación del 0 (aparición normal del músculo) al 4 (“*End-stage*”/sustitución completa del músculo por tejido conectivo y grasa).

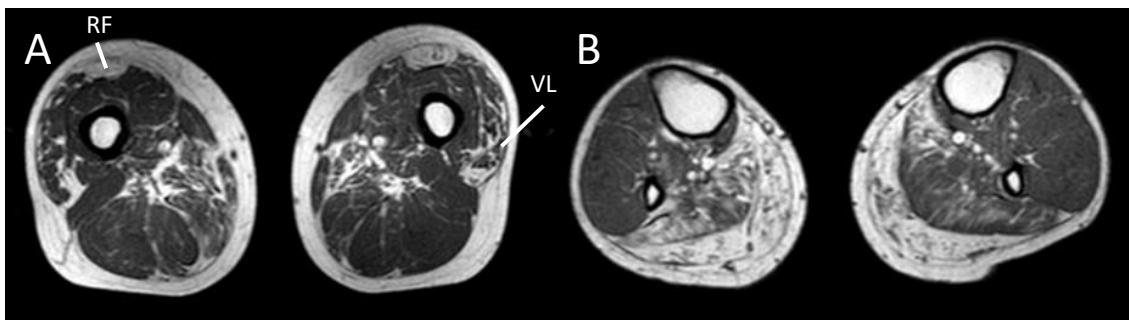




**Figura 5.** RM muscular a nivel de piernas de un sujeto asintomático. Los músculos muestran un aspecto normal.



**Figura 6.** RM muscular a nivel de piernas (A) y pies (B) de un paciente afecto de NHMd por mutación en el gen *HSPB1*. Se observa infiltración grasa de los músculos de las piernas en grado variable, aunque de predominio en sóleo (Sol), gemelo medial (GMed) y peroneo (Per). En la musculatura intrínseca de pies hay una infiltración grasa grave de todos los músculos.



**Figura 7.** RM muscular a nivel de muslos (A) y piernas (B) de un paciente afecto de NHMd/SMALED por mutación en el gen *DYNC1H1*. Se observa infiltración grasa difusa del cuádriceps, que predomina en el recto femoral (RF) y vasto lateral (VL). En la pierna hay mayor afectación los músculos del compartimento posterior, con preservación de los músculos del compartimento antero-medial, como es característico de esta entidad.

### Los estudios genéticos

El abordaje del estudio genético de los pacientes con neuropatías hereditarias tipo CMT, incluyendo las NHMd ha cambiado en los últimos años con la aparición de las técnicas de secuenciación masiva, también llamadas tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS: next generation sequencing) que permiten la secuenciación simultánea de grandes cantidades de ADN. Inicialmente, los loci y genes relacionados con las neuropatías tipo CMT se identificaban mediante estudios de ligamiento genético, clonación posicional o estudio de genes candidatos (Timmerman *et al.*, 2014). Desde la secuenciación y publicación del Genoma Humano en 2001 y el posterior desarrollo de las técnicas NGS como el estudio mediante panel de genes, el estudio de exoma completo y la secuenciación de genoma completo, se ha acelerado enormemente la identificación de nuevos genes y mutaciones en las neuropatías genéticas tipo CMT. Actualmente, se han identificado mutaciones causantes de neuropatías genéticas tipo CMT en más de 100 genes diferentes (<http://neuromuscular.wustl.edu/>) y las técnicas NGS se utilizan como método diagnóstico de rutina; de hecho el uso de paneles que incluyen genes conocidos relacionados con neuropatías tipo CMT son hoy en día el método preferido en la práctica clínica para estudiar a los pacientes afectados de CMT (Lupo *et al.*, 2016)(Nam *et al.*, 2016). El estudio de exoma completo o WES (*Whole- exome sequencing*) se basa en la amplificación y secuenciación de las regiones codificantes del genoma. En los últimos años la técnica WES ha sido útil para el estudio de pacientes afectados de neuropatía tipo CMT (Choi *et al.*, 2012; Hartley *et al.*, 2018) y para la identificación de nuevos genes causantes (Higuchi *et al.*, 2016), ya que una de las ventajas del WES es que permite la secuenciación de genes que no se han relacionado previamente con las neuropatías tipo CMT u otras enfermedades. Otra ventaja respecto a los paneles de genes es que siempre permite realizar un reanálisis a medida que se identifican nuevos genes relacionados con CMT. Uno de los inconvenientes de esta técnica es que aunque ofrece una cobertura alta de las regiones codificantes, ésta no analiza las regiones intrónicas profundas, y en consecuencia algunas variantes genéticas responsables de la enfermedad pueden no identificarse. La secuenciación completa del genoma (*Whole genome sequencing* o WGS) permite detectar alteraciones localizadas fuera de

las regiones exónicas así como variaciones genómicas estructurales. Los estudios WGS han sido útiles para la identificación de nuevos genes causantes de neuropatías hereditarias (Cortese *et al.*, 2019; Pagnamenta *et al.*, 2021) y su uso cada vez está más extendido. Algunos autores, de hecho, sugieren la utilización del WGS como primera herramienta de estudio de los pacientes afectados de neuropatías tipo CMT (lo que se ha llamado 'genome- first'), sobre todo en los casos que no se clasifican como CMT1 (Pipis *et al.*, 2019).

Los estudios WES y WGS identifican una gran cantidad de variantes que es necesario filtrar e interpretar junto a la clínica, por lo que hoy en día sigue siendo fundamental una valoración y descripción fenotípica cuidadosa de los pacientes y la determinación del modo de herencia probable.

## El rendimiento diagnóstico de las NHMd

Dentro de los subgrupos de CMT, el rendimiento diagnóstico del estudio genético es mucho mayor en las formas desmielinizantes (>85% de los pacientes) que en las axonales. Dentro de éstas últimas el rendimiento es mayor en el CMT2 (25-35%) que en las NHMd (15-25%) (Pipis *et al.*, 2019). En concreto, el rendimiento diagnóstico en grandes series de NHMd estudiadas mediante secuenciación gen a gen por Sanger sólo fue del 15% (Dierick *et al.*, 2008) y actualmente en la era de NGS es de alrededor del 30% (Bansagi *et al.*, 2017). Esto se debe a que presumiblemente en la mayoría de pacientes afectados de NHMd la enfermedad está causada por mutaciones en genes aún “no conocidos” o reordenamientos genómicos.

La epidemiología genética de las NHMd, como la de cualquier enfermedad rara, presenta notables variaciones en las diferentes poblaciones. Existen pocas series publicadas de NHMd, y la distribución genética en ellas es bastante heterogénea (Dierick *et al.*, 2008; Bansagi *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2020). Por otro lado, también hay que tener en cuenta que en aquellos grupos étnicos genéticamente aislados, con alta tasa de endogamia o mutaciones fundadoras, determinadas mutaciones pueden ser muy frecuentes y explicar la mayoría de casos (Pipis *et al.*, 2019).

## Patomecanismos de las NHMd

Los genes mutados responsables de la NHMd codifican para proteínas con funciones importantes para la supervivencia neuronal y de los axones motores como por ejemplo: plegamiento erróneo, metabolismo del RNA, transporte axonal o disfunción de canales catiónicos en los nervios motores (Laurá *et al.*, 2019). Algunos de estos genes codifican proteínas que están implicadas en varias funciones celulares, como por ejemplo es el caso de HSPB1, que actúa como chaperona molecular (Boncoraglio *et al.*, 2012), pero también se ha implicado en el transporte celular (Ackerley *et al.*, 2006). Otros genes codifican proteínas cuya función no se conoce con exactitud. Además, hay que tener en cuenta que el descubrimiento continuo de nuevos genes relacionados con NHMd está revelando nuevos mecanismos patogénicos no descritos hasta ahora (Cortese *et al.*, 2020b).

Desde un punto de vista fisiopatológico podríamos clasificar los genes implicados en las NHMd en los siguientes grupos (Rossor *et al.*, 2016; Beijer and Baets, 2020):

- Transporte axonal: *BICD2, DCTN1, DYNC1H1, HSPB1, MYH14*
- Aminoacilación de ARNt: *AARS1, GARS1, HARS1, HINT1, WARS1*
- Metabolismo de ADN y ARNm, biogénesis de ribosomas: *FBXO38, IGHMBP2, LAS1L, SETX, VRK1*
- Canales iónicos/transportadores: *ATP7A, SLC12A6, TRPV4*
- Chaperonas/agregación proteica: *DNAJB2, HSPB1, HSPB3, HSPB8*
- Retículo endoplasmático y órgano de Golgi: *BSCL2, SIGMAR1, REEP1*
- Transmisión sináptica: *SLC5A7, SYT2, PLEKHG5*
- Proteínas de la matriz extracelular y del citoesqueleto: *FBLN5, SPTAN1*
- Señalización celular: *MME*
- Metabolismo del sorbitol: *SORD*
- Mitocondria: *CHCHD10, SLC25A21*

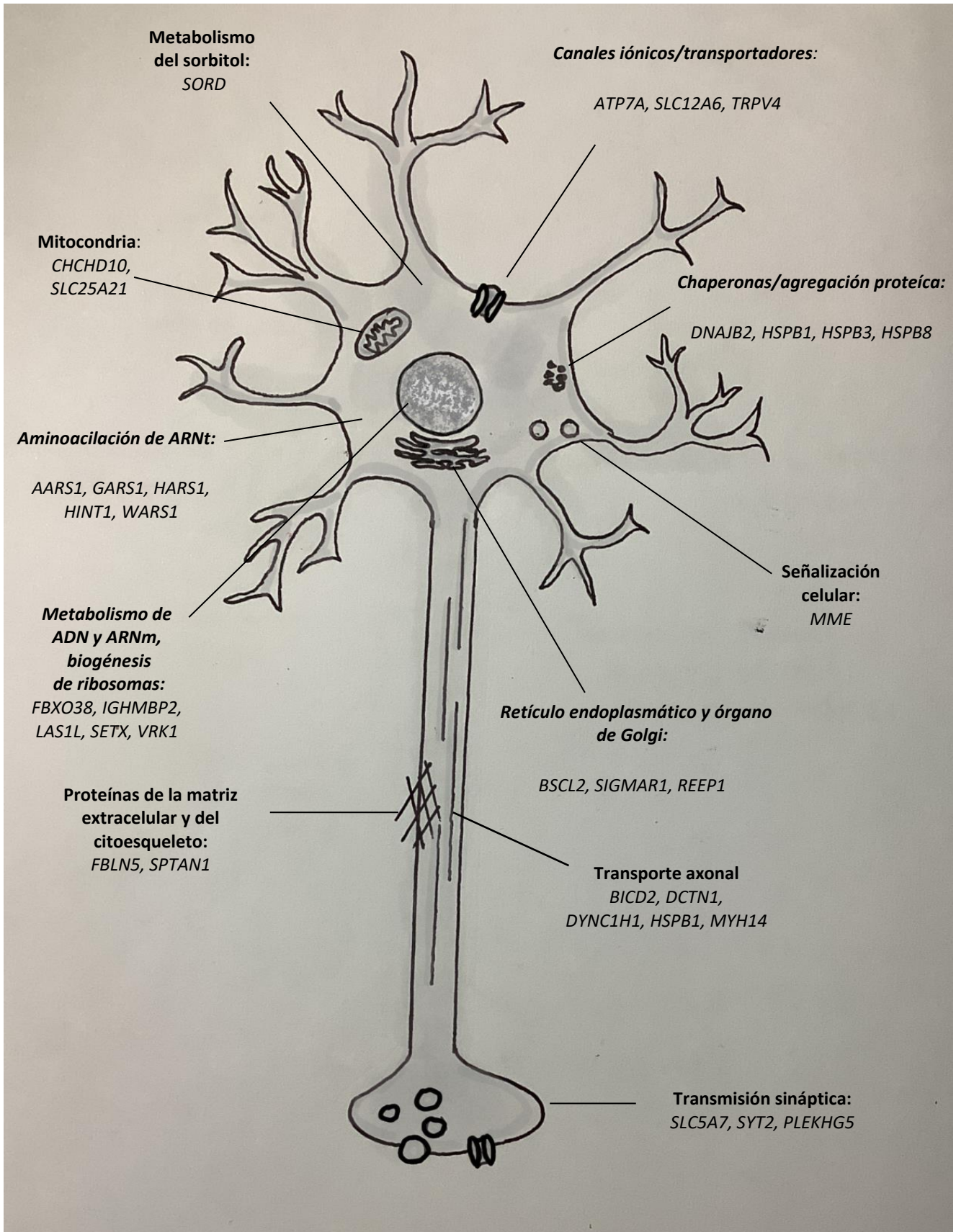


Figura 8. Patomecanismos implicados en las NHMd.

## Genes implicados en las NHMd

A continuación, en orden alfabético, se enumeran los diferentes genes asociados con NHMd hasta la fecha, las características fenotípicas y los mecanismos biológicos asociados a los mismos.

### ***AARS1 (Alanyl-tRNA synthetase 1)***

El gen *AARS1* codifica una proteína de la familia de las aminoacil-*tRNA sintetasas*. Las mutaciones en *AARS1* se describieron inicialmente como causa de CMT con VCM en rango axonal-intermedio (Latour *et al.*, 2010). Posteriormente se describió una familia china con fenotipo de NHMd por la mutación c.2677G>A (Zhao *et al.*, 2012). La edad de inicio de la enfermedad es muy variable, desde la primera hasta la sexta década de vida, y el fenotipo es de una NHMd clásica. La RM muscular muestra afectación de gastrocnemios y vastos laterales (Zhao *et al.*, 2012). El resto de familias descritas con mutaciones en *AARS1* tienen afectación motora y sensitiva (Weterman *et al.*, 2018), con VCM en rango intermedio, si bien en algunos de estos casos predomina claramente la clínica motora sobre la sensitiva (Bansagi *et al.*, 2015a).

### ***AIFM1 (Apoptosis-inducing factor 1)***

El gen *AIFM1* codifica el factor inductor de apoptosis, una proteína mitocondrial implicada en la apoptosis celular y en el metabolismo mitocondrial normal, donde juega un papel en la regulación de la cadena respiratoria (Hangen *et al.*, 2010).

Se han descrito varios síndromes con herencia recesiva ligada al X causados por mutaciones en *AIFM1* como encefalomiopatía mitocondrial (Ghezzi *et al.*, 2010), síndrome de Cowchock (neuropatía axonal, sordera, déficit cognitivo) (Rinaldi *et al.*, 2012) o sordera debido a neuropatía auditiva (Zong *et al.*, 2015). En 2017 se identificó la mutación c.629T>C (p.F210S) en *AIFM1* en dos hermanos afectados de NHMd (Sancho *et al.*, 2017). Los pacientes descritos presentaban una neuropatía motora de inicio temprano, con retraso en el inicio de la marcha. La debilidad se inició en musculatura

distal de miembros inferiores con progresión a músculos proximales y a miembros superiores, siguiendo un patrón clásico longitud-dependiente. Los pacientes presentaron una discapacidad grave, con pérdida de la capacidad de deambular a los 11 años en uno de ellos. No presentaron déficit cognitivo, visual ni auditivo.

Los estudios funcionales mostraron fragmentación de la red mitocondrial en los fibroblastos de los pacientes.

### ***ATP7A (ATPase Copper Transporting Alpha)***

El gen *ATP7A* codifica una proteína transportadora de cobre (Vulpe *et al.*, 1993). En 2004 se describió una familia brasileña en la que había 17 pacientes varones afectados de NHMd y en la que el árbol genealógico era compatible con una herencia recesiva ligada al X (Takata *et al.*, 2004). El fenotipo consistía en una NHMd clásica con una edad de inicio en la primera década de vida, deformidad de pies, debilidad y atrofia distal de inicio en miembros inferiores y posteriormente superiores. La afectación en miembros inferiores era de predominio en el compartimento tibioperoneal y el curso de la enfermedad lentamente progresivo. Los estudios electrofisiológicos mostraron disminución de los CMAPs con denervación crónica en el EMG. En 2009 se describió otra familia con NHMd con herencia ligada al X (Kennerson *et al.*, 2009). En este caso la edad de inicio fue entre 10-30 años y el fenotipo el de una NHMd “típica” con un curso lentamente progresivo. Algunos de los pacientes presentaban leves alteraciones clínicas sensitivas, pero solo uno de ellos presentaba disminución del PSE del nervio sural, aunque los autores consideraron que existía una causa adquirida de neuropatía que explicaba esta alteración. En 2010 se identificaron dos mutaciones diferentes en el gen *ATP7A* en los pacientes afectados de estas dos familias (Kennerson *et al.*, 2010). Recientemente se ha descrito una familia con NHMd por una nueva mutación en *ATP7A*, en la que los pacientes presentan disautonomía y leve afectación sensitiva (Gualandi *et al.*, 2019).



***BICD2 (Bicaudal D2 Drosophila homologue 2)***

La proteína BICD2 interacciona con el complejo motor de la dineína-dinactina e interviene en transporte celular ligado a microtúbulos (Hoogenraad *et al.*, 2003; Grigoriev *et al.*, 2007; Splinter *et al.*, 2010). Las mutaciones en *BICD2* causan “Atrofia muscular espinal de predominio en extremidades inferiores, 2A”, una entidad también conocida por su acrónimo en inglés SMALED2A (Spinal muscular atrophy, lower extremity predominant 2A) (Oates *et al.*, 2012; Neveling *et al.*, 2013; Peeters *et al.*, 2013). El patrón de herencia es AD, aunque son frecuentes las mutaciones *de novo* (Bansagi *et al.*, 2015b, Rossor *et al.*, 2015b). La edad de inicio suele ser en la infancia, incluyendo casos congénitos, aunque se han descrito algunos casos de inicio en la edad adulta (Synofzik *et al.*, 2014). El fenotipo asociado con las mutaciones en este gen se caracteriza por debilidad y atrofia en los músculos proximales y/o distales de las extremidades inferiores, que frecuentemente puede asociar contracturas en articulaciones de tobillos y rodillas, y en ocasiones otras características como: luxación congénita de cadera, deformidad de pies, hiperlordosis lumbar, escapula alada o signos de motoneurona superior. El curso de la enfermedad es estático o lentamente progresivo (Rossor *et al.*, 2015b). Los estudios electrofisiológicos muestran ECN normales en la mayoría de pacientes, con denervación crónica en el EMG. La RM muscular muestra un patrón típico de afectación con sustitución grasa generalizada en los músculos de muslos, respetando los adductores y semitendinosos (Oates *et al.*, 2012; Synofzik *et al.*, 2014, Bansagi *et al.*, 2015b, Rossor *et al.*, 2015b; Unger *et al.*, 2016). Se han descrito casos aislados que difieren del fenotipo típico (Bacquet *et al.*, 2018; Souza *et al.*, 2018).

***BSCL2 (Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy)***

La proteína BSCL2 o seipina, es una proteína de membrana del retículo endoplasmático que está implicada en la diferenciación de los adipocitos y metabolismo de los lípidos (Cui *et al.*, 2011). Las mutaciones en heterocigosis en el gen *BSCL2* pueden causar diferentes fenotipos: Síndrome de Silver (combinación de paraparesia espástica y atrofia de la musculatura en manos) (Silver, 1966), NHMd de predominio en manos (NHMd-V) o NHMd clásica de predominio en miembros inferiores (Windpassinger *et*

*al.*, 2004). La edad de inicio puede ser muy variable, desde la primera hasta la octava década de vida y con frecuencia los pacientes presentan deformidad de pies (Windpassinger *et al.*, 2003, Irobi *et al.*, 2004a). Los estudios electrofisiológicos pueden ser normales en algunos pacientes que presentan paraparesia espástica pura sin neuropatía, pero en general muestran la existencia de una neuropatía periférica motora pura o de predominio motor (Windpassinger *et al.*, 2003, Irobi *et al.*, 2004a). En algunos pacientes se ha descrito la disminución de los CMAP, sobre todo en los nervios peroneal y mediano, con disminución leve-moderada de la VCM (Windpassinger *et al.*, 2003). En otras familias con fenotipo de NHMd debido a mutaciones en *BSCL2* los estudios electrofisiológicos muestran disminución generalizada de los CMAP, con denervación crónica y VCN normales (Irobi *et al.*, 2004a). Algunos pacientes presentan clínica sensitiva y alteraciones sensitivas en los ECN. Se ha descrito que éstas aparecen a medida que la enfermedad progresa y están presentes en los pacientes de mayor edad y (Van Gent *et al.*, 1985; Windpassinger *et al.*, 2003).

Mutaciones bialélicas en este mismo gen son causa de lipodistrofia congénita de Berardinelli-Seip (Magré *et al.*, 2001).

### ***CHCHD10 (Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 10)***

CHCHD10 es una proteína localizada en el espacio intermembranoso de la mitocondria. Se ha hipotetizado que puede estar implicada en el mantenimiento de la morfología de las crestas mitocondriales y en la fosforilación oxidativa (Bannwarth *et al.*, 2014). La mutación fundadora c.197G>T (p.G66V) en heterocigosis en el gen *CHCHD10* es la causa de un síndrome de motoneurona inferior de inicio tardío descrito en varias familias finlandesas (Penttilä *et al.*, 2015). La enfermedad se inicia a una edad adulta con calambres musculares, seguido de debilidad muy lentamente progresiva, que suele aparecer por encima de los 45 años y que afecta a musculatura proximal y distal de extremidades y músculos abdominales. No hay afectación respiratoria ni de musculatura bulbar ni facial. Los pacientes presentan hiporreflexia/arreflexia y el EMG muestra cambios neurógenos generalizados (Jokela *et al.*, 2011; Penttilä *et al.*, 2012).

La RM muscular de muslos y piernas muestra sustitución grasa difusa, que predomina sobre todo en gemelo medial y, en menor medida, en sóleo, vasto lateral e isquiotibiales (Jokela *et al.*, 2011). Este cuadro también es llamado “Atrofia Muscular Espinal tipo Jokela (SMAJ)” o “Lower motor neuron syndrome with late-adult onset (LOSMoN).

### ***DCTN1 (Dynactin subunit 1)***

El gen *DCTN1* codifica una de las subunidades de la dinactina, proteína que se une directamente a los microtúbulos y a la dineína citoplasmática y que interviene, por tanto, en el transporte intracelular de vesículas y orgánulos (Holzbaur and Tokito, 1996). En una familia con un cuadro de enfermedad de motoneurona inferior lentamente progresivo con parálisis de cuerdas vocales y herencia AD se identificó la mutación c.957C>T (p.G59S) en el gen *DCTN1* (Puls *et al.*, 2003). La enfermedad debuta en adultos jóvenes y cursa con parálisis de cuerda vocal, debilidad facial progresiva y debilidad y atrofia distal en extremidades. Ésta última aparece primero en extremidades superiores y más tarde en inferiores. Hasta el momento no se han descrito otras familias con NHMd por mutaciones en *DCTN1*, aunque mutaciones en este gen se han descrito como causa de Síndrome de Perry (Farrer *et al.*, 2009), un cuadro de herencia AD caracterizado por depresión grave, alteraciones del sueño, pérdida de peso, parkinsonismo e insuficiencia respiratoria (Perry *et al.*, 1975).

### ***DNAJB2/HSJ1 (DNAJ/HSP40 Homolog, subfamily B, Member 2)***

El gen *DNAJB2* o *HSJ1* codifica una co-chaperona de la familia de las “heat shock proteins”, implicadas en el mantenimiento de un correcto plegamiento de las proteínas y en la degradación de aquellas que presentan un plegamiento erróneo (Blumen *et al.*, 2012). In vitro, HSJ1 evita la formación de agregados compuestos por SOD1 y Parkina mutadas, implicadas en ELA y enfermedad de Parkinson, respectivamente (Rose *et al.*, 2011; Blumen *et al.*, 2012). Se han descrito varias familias con NHMd debido a mutaciones recesivas en *DNAJB2*. La primera familia descrita era

portadora de la mutación c.352+1G>A en homocigosis y presentaba un fenotipo de NHMd de inicio en la segunda-tercera década de vida (Blumen *et al.*, 2012). Posteriormente se describieron otras dos familias con diferentes cambios en homocigosis: una con fenotipo NHMd de inicio en la adolescencia y la mutación c.229+1G>A, y la otra con fenotipo CMT2 de inicio en la tercera década de vida y con la mutación c.14A>G (p.Tyr5Cys). Desde entonces se han descrito algunas familias adicionales (Frasquet *et al.*, 2016; Sanchez *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2020), aunque el número de pacientes descritos es escaso en comparación con pacientes con mutaciones en otros genes. El fenotipo de los pacientes con mutaciones bialélicas en *DNAJB2* se caracteriza por una NHMd de inicio en la infancia o en adultos jóvenes y con un curso progresivo de forma que la debilidad y atrofia inicialmente está presente en musculatura distal de extremidades inferiores, pero posteriormente se extiende a músculos proximales y más tarde a miembros superiores, musculatura bulbar y respiratoria. La afectación clínica y electrofisiológica es motora pura en los primeros años de enfermedad, pero posteriormente se añade una afectación sensitiva (Frasquet *et al.*, 2016). Los pacientes pueden presentar parkinsonismo de inicio temprano (Frasquet *et al.*, 2016; Sanchez *et al.*, 2016) y piramidismo (Liu *et al.*, 2020).

### ***DYNC1H1 (Dynein cytoplasmic 1 heavy chain 1)***

El gen *DYNC1H1* codifica una de las subunidades del complejo de la dineína citoplasmática, una importante proteína motora asociada a los microtúbulos que participa en el transporte retrógrado de las sustancias en la célula (Reck-Peterson *et al.*, 2018). Las mutaciones en *DYNC1H1* causan *Spinal muscular atrophy, lower extremity predominant 1* (SMALED 1). Los pacientes afectados de SMALED 1 presentan debilidad en extremidades inferiores de inicio congénito o en la infancia temprana y de curso estático o lentamente progresivo. Otras características clínicas que pueden estar presentes son artrogriposis, deformidad de pies, atrofia de musculatura escapular o hiperlordosis lumbar (Weedon *et al.*, 2011; Harms *et al.*, 2012; Scoto *et al.*, 2015). Los estudios electrofisiológicos de los pacientes muestran reducción de los CMAPs con denervación crónica en el EMG y respuestas sensitivas normales (Harms *et al.*, 2012;

Scoto *et al.*, 2015). La RM muscular muestra un patrón típico con afectación difusa de cuádriceps y preservación del adductor magnus, adductor longus y semitendinoso a nivel del muslo. A nivel de la pierna hay mayor afectación de los músculos del compartimento posterior, con preservación de los músculos del compartimento antero-medial (Scoto *et al.*, 2015). El fenotipo y curso clínico de los pacientes con mutaciones en *DYNC1H1* es muy similar al del cuadro producido por mutaciones en *BICD2* y la RM muscular en ambos casos es muy similar (Rossor *et al.*, 2015b). Algunos pacientes con mutaciones en *DYNC1H1* pueden presentar discapacidad intelectual y epilepsia asociadas a alteraciones de la migración neuronal en el SNC (Scoto *et al.*, 2015).

### ***FBXO38 (F-Box Protein 38)***

Inicialmente se describieron dos familias con “AED distal de predominio en pantorrillas” debido a mutaciones dominantes en *FBXO38* (Sumner *et al.*, 2013). Una de estas familias se había descrito en detalle desde un punto de vista clínico unos años antes (Boylan *et al.*, 1995). El síntoma inicial más frecuente en estos pacientes fue la debilidad en los músculos flexores plantares con posterior afectación de otra musculatura distal y proximal de miembros inferiores y superiores, donde predomina la afectación de los músculos intrínsecos de mano y tríceps. La edad de inicio de la clínica se situaba entre 13 y 48 años. Los estudios electrofisiológicos mostraron denervación crónica en el EMG con presencia de fibrilaciones y ondas positivas en algunos músculos y disminución de los CMAP en los pacientes de mayor edad. En una de las familias se determinaron los niveles de creatin kinasa (CK) en seis pacientes, estando los valores por encima del rango normal en cinco de ellos (Boylan *et al.*, 1995). En 2019 se describió una paciente con NHMd de inicio congénito asociada a hipoacusia y malformaciones orgánicas en la que se detectó una mutación *missense* en homocigosis en *FBXO38* mediante estudio exoma (Akçimen *et al.*, 2019). La paciente presentaba una NHMd clásica con pies cavos y debilidad distal de miembros inferiores, con posterior afectación de musculatura distal de miembros superiores. El estudio electrofisiológico mostró disminución de los CMAPs con denervación crónica en el EMG. *FBXO38* es un coactivador del factor de transcripción KLF7, que a su vez regula

genes implicados en el crecimiento y reparación axonal (Blackmore *et al.*, 2012; Sumner *et al.*, 2013).

### ***FBLN5 (Fibulin-5)***

Las mutaciones en heterocigosis en el gen *FBLN5* se han descrito como causa de neuropatía periférica, cutis laxa y degeneración macular asociada a la edad (Auer-Grumbach *et al.*, 2011). La fibulina 5 es una glicoproteína matricelular que interviene en la formación de fibras elásticas (Yanagisawa *et al.*, 2009). La mayoría de los pacientes descritos con neuropatía por mutaciones en *FBLN5* están diagnosticados de CMT1, pero se han descrito al menos dos familias con neuropatía periférica tipo NHMd (Auer-Grumbach *et al.*, 2011). En una de estas familias el inicio de la clínica fue en la infancia y en la otra en la edad adulta. El patrón de afectación es de una NHMd típica con afectación preferente en musculatura distal de miembros inferiores. Algunos de los pacientes presentan hiperelasticidad cutánea o hiperlaxitud articular así como degeneración macular asociada a la edad. Cabe resaltar que en algunos casos la neuropatía es leve o asintomática.

### ***GARS1 (Glicil-tRNA synthetase 1)***

La glicil tRNA sintetasa es responsable de “cargar” las moléculas de tRNA con el aminoácido glicina (Griffin *et al.*, 2014). Mutaciones en *GARS1* causan CMT2D y NHMd de predominio en manos y herencia AD (Antonellis *et al.*, 2003), clásicamente llamada NHMd-V. La edad de inicio es variable, pero lo más frecuente es que sea en la segunda o tercera década de vida. La debilidad y atrofia suele ser de inicio en manos, con predominio en eminencia tenar y primer interóseo y posterior afectación distal de miembros inferiores. Algunos pacientes presentan signos piramidales (Christodoulou *et al.*, 1995; Antonellis *et al.*, 2003; Sivakumar *et al.*, 2005). El estudio electrofisiológico muestra reducción de los CMAPs con denervación crónica y actividad espontánea en los músculos afectados (Sivakumar *et al.*, 2005). El fenotipo asociado a mutaciones en *GARS1* es un “continuo” entre NHMd y CMT2D, los pacientes con una misma mutación pueden presentar uno u otro fenotipo, independientemente del

tiempo de evolución de la enfermedad y es frecuente que algunos pacientes con NHMd presenten mínima alteración de la sensibilidad vibratoria en el examen. Cuando existe alteración sensitiva franca, desde un punto clínico y electrofisiológico, los pacientes son diagnosticados de CMT2D. Ambos fenotipos, NHMd y CMT2, pueden coexistir dentro de una misma familia (Sivakumar *et al.*, 2005).

### ***HARS1 (Histidyl-tRNA synthetase)***

*HARS1* codifica la enzima histidyl-tRNA sintetasa, otra de las proteínas perteneciente a la familia de las aminoacil-tRNA sintetasas. *HARS1* cataliza la unión covalente de la histidina con su tRNA afín en el proceso de biosíntesis de proteínas (O’Hanlon and Miller, 2002). Las mutaciones en *HARS1* se han descrito en pacientes afectados de diferentes fenotipos dentro del espectro de las neuropatías tipo CMT. Inicialmente se identificó la mutación p.Arg137Gln en pacientes afectados de neuropatía periférica de predominio sensitivo (Vester *et al.*, 2013). Posteriormente se identificaron diferentes mutaciones en heterocigosis en *HARS1* en varias familias afectas de neuropatías hereditarias, el fenotipo de estas familias es variable, se clasifican como CMT2 o CMT desmielinizante. Algunos de los pacientes jóvenes de estas familias afectas de CMT2 solo presentaban afectación motora y fueron clasificados como NHMd. Por último, se han descrito otras familias adicionales afectas de NHMd o “CMT de predominio motor” (Abbott *et al.*, 2018), lo que confirma la relación entre *HARS1* y las NHMd.

Varios estudios demuestran que las mutaciones en *HARS1* producen una pérdida de función o reducción en la función de aminoacilación de la proteína (Vester *et al.*, 2013; Abbott *et al.*, 2018), aunque un estudio *in vitro* reciente demuestra que el patomecanismo relacionado con las *HARS1* mutantes depende de la conformación de la proteína más que de la pérdida de la función de aminoacilación (Blocquel *et al.*, 2019).

### ***HINT1 (Histidine triad nucleotide-binding protein 1)***

El gen *HINT1* codifica una proteína cuya función es hidrolizar los aminoacil adenilatos, productos intermedios en la reacción de carga de los tRNA, con sus correspondientes aminoácidos (reacción a su vez mediada por las aminoacil-tRNA sintetasas) y también es un supresor de tumores que participa en vías de la apoptosis (Zimoń *et al.*, 2012; Peeters *et al.*, 2017). En 2012 se identificaron mutaciones bialélicas en *HINT1* en varias familias afectas de neuropatía axonal tipo CMT asociada a neuromiotonía (Zimoń *et al.*, 2012). Desde entonces se han descrito varias familias con neuropatía por diferentes mutaciones recesivas en *HINT1*, sobre todo en el este de Europa, donde existen varias mutaciones fundadoras (Peeters *et al.*, 2017). La mayoría de pacientes presentan una neuropatía tipo CMT2 de predominio motor, pero algunos de ellos pueden presentar afectación exclusivamente motora y son diagnosticados, por tanto, de una NHMd. La clínica suele debutar en la infancia, y el curso es lentamente progresivo, con debilidad de predominio distal en miembros inferiores. Un rasgo muy típico presente en el 80% de los pacientes es la existencia de neuromiotonía en el EMG, que se traduce clínicamente en forma de calambres, sensación de rigidez muscular y miotonía (Zimoń *et al.*, 2012). Las CKs están elevadas en algunos pacientes en rangos muy variables, entre 300-1200 U/L (Zimoń *et al.*, 2012).

### ***HSPB1 (Heat shock protein B1)***

Las mutaciones en *HSPB1* son una causa relativamente frecuente de NHMd (Dierick *et al.*, 2008; Capponi *et al.*, 2011). La proteína HSPB1 forma parte de la familia de las “small heat shock proteins” (sHSP), compuesta por 10 proteínas (HSPB1-HSPB10) que son ubicuas y que tienen en común un dominio “alfa-cristalina” muy conservado. Las sHSP actúan como chaperonas moleculares uniéndose a proteínas dañadas o que presentan un plegamiento incorrecto para facilitar su reparación o su eliminación, evitando de esta forma que formen agregados (Carra *et al.*, 2005; Boncoraglio *et al.*, 2012). La HSPB1 también está implicada en la interacción y mantenimiento del citoesqueleto y el transporte celular (Ackerley *et al.*, 2006; Zhai *et al.*, 2007). Las mutaciones en *HSPB1* causan NHMd y CMT2 de herencia AD, aunque se ha descrito un



caso de herencia AR (Houlden *et al.*, 2008). El fenotipo es el de una NHMd “clásica”, con un inicio que suele situarse en la edad adulta y un patrón de debilidad longitud-dependiente de predominio en miembros inferiores. Al contrario de lo que ocurre con la mayoría de neuropatías de la familia CMT, los pacientes con mutaciones en *HSPB1* presentan una debilidad grave temprana en los músculos flexores plantares y la RM muscular muestra afectación predominante del gemelo medial y del sóleo (Rossor *et al.*, 2017b). Por otro lado, se han descrito pacientes con debilidad y atrofia distal de extremidades debido a mutaciones en *HSPB1* a los que se ha diagnosticado de cuadros mixtos “neuromiopáticos” en base a los hallazgos de la biopsia muscular que muestra rasgos combinados de ambos procesos y presencia de vacuolas en las fibras musculares. Además, estos pacientes presentan cifras de CKs superiores a 1000 (Lewis-Smith *et al.*, 2016; Bugiardini *et al.*, 2017).

### ***HSPB3 (Heat shock protein B3)***

El gen *HSPB3*, un parálogo del *HSPB1*, codifica para otra de las proteínas del grupo de las sHSP. Las mutaciones en *HSPB3* se han relacionado con neuropatías genéticas del grupo CMT, pero los casos descritos son muy escasos en comparación con los relacionados con mutaciones en *HSPB1*. En dos hermanas afectas de NHMd con herencia dominante se identificó la mutación c.21G>T (p.Arg7Ser) en heterocigosis en *HSPB3* (Kolb *et al.*, 2010). El fenotipo de las pacientes era de una NHMd de inicio en la tercera década de vida con debilidad y atrofia de los miembros inferiores con posterior debilidad de la musculatura intrínseca de manos. La afectación sensitiva descrita es mínima en forma de hallazgos sutiles en el examen y ausencia del PSE del peroneo superficial, con normalidad del sural, en el estudio electrofisiológico realizado a una de las pacientes. Posteriormente, se ha descrito una familia con CMT2 de herencia AD debido a la mutación c.352T>C (p.Tyr118His) en heterocigosis en *HSPB3* (Nam *et al.*, 2018). En este caso, aunque el fenotipo es similar al de las pacientes descritas por Kolb *et al.*, existía una afectación clínica y electrofisiológica sensitiva importante.

### ***HSPB8 (Heat shock protein B8)***

Las mutaciones en *HSPB8* pueden causar NHMd, aunque son mucho menos frecuentes que las que afectan al gen *HSPB1* (Capponi *et al.*, 2011; Echaniz-Laguna *et al.*, 2017). En una gran familia diagnosticada de NHMd de inicio en adultos jóvenes y herencia AD (Timmerman *et al.*, 1992) se identificó la mutación en heterocigosis 423G>C (Lys141Asn) en el gen *HSPB8* (Irobi *et al.*, 2004b). Esta misma mutación se identificó en una familia checa con NHMd. En otras dos familias afectas de NHMd y de diferente origen se identificó la mutación 421A>G (Lys141Glu) (Irobi, Van Impe, *et al.*, 2004). Desde entonces se han descrito varias familias afectas de NHMd debido a mutaciones en este gen, en varias de ellas la mutación conlleva la sustitución del aminoácido lisina localizado en posición 141 de la proteína, como ocurre en las familias comentadas anteriormente, aunque también se han descrito mutaciones en otras localizaciones (Echaniz-Laguna *et al.*, 2017). Las mutaciones en *HSPB8* también se pueden manifestar como CMT2 (Tang *et al.*, 2005) y en forma de miopatía con hallazgos histológicos compatibles con una miopatía miofibrilar con vacuolas ribeteadas (Ghaoui *et al.*, 2016).

### ***IGHMBP2 (IMMUNOGLOBULIN MU-BINDING PROTEIN 2)***

El gen *IGHMBP2* codifica una helicasa que se asocia de forma directa a los ribosomas, aunque su función exacta no se conoce (Guenther *et al.*, 2009). Las mutaciones bialélicas en este gen pueden causar la entidad conocida como “spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1” (*SMARD1*) (Grohmann *et al.*, 2001a), también conocida como “atrofia muscular espinal diafragmática” y que correspondería a la NHMd tipo VI de la clasificación de Harding (Harding, 2005). En muchos pacientes afectos de *SMARD1* ya se observan anomalías prenatales como retraso del crecimiento intrauterino o disminución de los movimientos fetales y es frecuente la presencia de deformidad congénita de pies (Wilmshurst *et al.*, 2001; Grohmann *et al.*, 2003). La debilidad muscular se caracteriza por comenzar a nivel distal de miembros inferiores, extendiéndose posteriormente a musculatura distal de miembros superiores y progresando de forma rápida hasta afectar de forma generalizada a los músculos de

extremidades y tronco. Esta entidad se caracteriza por la existencia de una debilidad diafragmática temprana que provoca afectación respiratoria muy precoz, que incluso puede preceder a la debilidad de extremidades. La *SMARD1* se diferencia de la atrofia muscular espinal (AME) tipo 1 en el hecho de que en la AME tipo 1 la debilidad inicialmente afecta a musculatura proximal de extremidades y ésta precede a la aparición de insuficiencia respiratoria (Grohmann *et al.*, 2003).

Las mutaciones recesivas en el gen *IGHMBP2* también se han descrito como causantes de CMT2 de inicio en infancia y de fenotipo “típico”, caracterizado por debilidad distal de extremidades asociada a afectación sensitiva de curso lentamente progresivo y sin afectación respiratoria (Cottenie *et al.*, 2014). Aunque los pacientes descritos por Cottenie *et al.* fueron diagnosticados de CMT2, al menos una de las familias descritas por los autores presentaba una afectación clínica y electrofisiológica motora pura, y de hecho esta misma familia aparece diagnosticada de NHMd en la serie de Bansagi *et al.* (Bansagi *et al.*, 2017), por lo que se podría afirmar que las mutaciones en *IGHMBP2* pueden causar tanto CMT2 como NHMd de herencia AR, además de *SMARD1*.

### ***LAS1L (LAS1 Like Ribosome Biogenesis Factor)***

El gen *LAS1-like* está localizado en el cromosoma X y juega un papel fundamental en la biogénesis de los ribosomas (Butterfield *et al.*, 2014).

En un paciente con un cuadro de inicio congénito de hipotonía, contracturas distales en extremidades e insuficiencia respiratoria debido a debilidad diafragmática, se identificó la mutación de novo c.1430G.A (p.S477N) en el gen *LAS1L* (Butterfield *et al.*, 2014). El estudio electrofisiológico del paciente demostró disminución generalizada de los CMAPs de predominio en extremidades inferiores, con denervación crónica en musculatura distal de extremidades. El fenotipo, por tanto, es muy similar al de *SMARD1* causado por mutaciones en *IGHMPB2*, que al igual que *LAS1L*, está involucrado en la biogénesis de ribosomas. En línea con las similitudes existentes entre ambos fenotipos, se ha acuñado el término *SMARD2* para describir el cuadro clínico relacionado con *LAS1L*. A priori esta parece una entidad muy rara, ya que hasta el

momento no se han identificado otros pacientes afectados de *SMARD2*. De hecho, los autores del artículo donde se describe el caso original analizaron el gen *LAS1L* en otros 11 pacientes con cuadros de neuropatía de inicio temprano, sin encontrar mutaciones en ninguno de ellos. Tampoco se encontraron cambios en 103 varones afectados de neuropatía motora de inicio previo a los 7 meses en los que se habían descartado mutaciones en *SMN1*, aunque en estos casos únicamente se estudió el exón 11 del gen *LAS1L*, incluyendo el cambio c.1430G .

### ***MME (Membrane Metalloendopeptidase)***

El gen *MME* codifica la neprilisina, una endopeptidasa localizada en la membrana celular y que interviene en el metabolismo de varios péptidos del sistema nervioso, cardiovascular, inflamatorio e inmunitario de los mamíferos (Turner *et al.*, 2001). Las mutaciones bialélicas en el gen *MME* causan CMT2 de inicio tardío (Higuchi *et al.*, 2016), cuya clínica inicial es predominantemente motora, aunque con la evolución la afectación sensitiva es evidente (Lupo *et al.*, 2018). Se han descrito escasos pacientes diagnosticados de NHMd por mutaciones recesivas en este gen (Hong *et al.*, 2019). Los tres pacientes descritos por Hong *et al.*, presentan un fenotipo típico de NHMd, con ausencia de afectación sensitiva a nivel clínico y electrofisiológico. Como los mismos autores sugieren, es posible que las mutaciones bialélicas en *MME* puedan dar lugar tanto a CMT2 como NHMd o que el fenotipo de los pacientes sea un continuo entre CMT2-NHMd y que el seguimiento a largo plazo revele que con el tiempo aparece una afectación sensitiva no presente previamente, al igual que ocurre con otros genes causantes de NHMd/CMT2 (Frasquet *et al.*, 2016). Dos de los pacientes descritos por Hong *et al.* presentan un inicio de la clínica en la quinta década de vida, en línea con lo que ocurre en los pacientes afectados de CMT2 recesivo por mutaciones en *MME* (Higuchi *et al.*, 2016; Lupo *et al.*, 2018), sin embargo la tercera paciente presenta un inicio de la clínica en la adolescencia.

Cabe resaltar que en la serie de neuropatías hereditarias del HUIP La Fe, todos los pacientes con neuropatía debido a mutaciones en *MME* han sido diagnosticados de CMT2 y ninguno de NHMd, si bien en general al inicio de la enfermedad predominaba

la clínica motora (Lupo *et al.*, 2018).

### ***MYH14 (MYOSIN, HEAVY CHAIN 14)***

El gen *MYH14* codifica una de las cadenas pesadas de las “miosinas no musculares de clase II”. Las miosinas son proteínas implicadas en varias funciones celulares como regulación de citoquinas, movimiento y polaridad celular (Shutova and Svitkina, 2018).

En una familia coreana con varios miembros afectados de un cuadro consistente en debilidad distal de predominio en miembros inferiores, asociada a “voz ronca” y sordera neurosensorial se identificó la mutación c.2822G>T (p.Arg941Leu) en el gen *MYH14* como responsable del cuadro clínico (Choi *et al.*, 2011). La edad de inicio de la clínica fue en la infancia (rango 5-14 años) en forma de debilidad que se iniciaba distalmente en miembros inferiores y que afectaba posteriormente a musculatura distal de miembros superiores y a músculos proximales de extremidades. La aparición de sordera y voz ronca ocurría años más tarde que el inicio de la debilidad. En estos pacientes los estudios electrofisiológicos mostraron hallazgos típicos de neuropatía motora en el ENG (reducción de los CMAPs) con hallazgos mixtos neurógenos y miopáticos en el EMG. Así mismo, la biopsia muscular mostró hallazgos tanto neurógenos como miopáticos. La RM muscular mostraba una afectación temprana de los músculos del compartimento anterior de la pierna, que posteriormente se extendía a compartimento lateral y posterior.

Esta misma mutación c.2822G>T (p.Arg941Leu) en *MYH14* se identificó en una familia norteamericana con varias generaciones afectas de un cuadro de debilidad distal de extremidades asociado a sordera neurosensorial de inicio en la infancia- juventud (4-23 años) (Iyadurai *et al.*, 2017). En este caso el EMG mostró hallazgos compatibles con una neuropatía motora axonal longitud-dependiente, sin hallazgos miopáticos. El diagnóstico de esta familia por tanto, fue de NHMd asociado a sordera. No se realizó biopsia muscular.

Las mutaciones en *MYH14* también causan sordera neurosensorial de herencia AD (Donaudy *et al.*, 2004).

***PLEKHG5 (Pleckstrin homology domain–containing, family G member 5 gene)***

En 2006, Maystadt *et al.* describieron una familia consanguínea originaria de Malí en la que cinco hermanos estaban afectados de un cuadro de segunda motoneurona de inicio en la infancia y curso progresivo (Maystadt *et al.*, 2006). Cuatro de los cinco hermanos presentaban un fenotipo grave de inicio entre los 2 y 3.5 años de edad con debilidad proximal de predominio en extremidades inferiores y afectación temprana de musculatura de pies y manos. El curso de la enfermedad fue rápidamente progresivo con pérdida de la capacidad de deambulación a una edad media de 8,5 años (7.5-9 años) y posterior desarrollo de debilidad muscular generalizada con aparición de insuficiencia respiratoria, contracturas, deformidad de pies, escoliosis e hiperlordosis lumbar. Los pacientes presentaban arreflexia y el examen de la sensibilidad fue normal. Tres de los cinco pacientes descritos requirieron ventilación asistida. No había afectación de musculatura craneal ni signos de primera motoneurona. Uno de los pacientes presentó un fenotipo menos grave que sus hermanos, caracterizado por un inicio más tardío de la clínica, a los 11 años, y un curso más lentamente progresivo. El estudio electrofisiológico mostró denervación crónica en todos los casos y en dos pacientes se describe afectación de las conducciones motoras y sensitivas. En esta familia inicialmente se descartaron mutaciones en *SMN1* y *SOD1*. Los estudios subsiguientes detectaron la mutación c.1940T>C (p.Phe647Ser) en homocigosis en el gen *PLEKHG5* (Maystadt *et al.*, 2007). Posteriormente se ha descrito una familia con fenotipo Charcot-Marie-Tooth con VCM en rango desmielinizante debido a mutaciones bialélicas en este mismo gen (Kim *et al.*, 2013).

El gen *PLEKHG5* se expresa predominantemente en el sistema nervioso periférico y codifica la proteína PLEKHG5. Se ha sugerido que PLEKHG5 podría estar implicada en la diferenciación neuronal a través de su participación en varias vías celulares (Kim *et al.*, 2013). Así mismo, PLEKHG5 regula la autofagia de vesículas sinápticas en el axón terminal de las motoneuronas a través de su función de intercambio de GDP por GTP para Rab26, una GTPasa que específicamente dirige las vesículas sinápticas a las estructuras *preautofagosomales* (Lüningschrör *et al.*, 2017).

***REEP1 (Receptor Expression-Enhancing Protein 1)***

La proteína REEP1 (receptor expression enhancing protein 1) se localiza en el retículo endoplasmático donde en sinergia con las proteínas espastina y atlastina-1 lleva a cabo su función, que consiste en regular la morfología del retículo endoplasmático y su interacción con los microtúbulos y mitocondrias (Park *et al.*, 2010; Lim *et al.*, 2015).

Las mutaciones en heterocigosis en el gen *REEP1* son una causa frecuente de paraparesia espástica (Züchner *et al.*, 2006) pero también en algunos raros casos pueden dar lugar a NHMd puras sin paraparesia, tanto NHMd clásica como NHMd de predominio en manos (NHMd-V) (Beetz *et al.*, 2012). También se han descrito casos de paraparesia combinada con atrofia y debilidad en manos (Toft *et al.*, 2019). Las mutaciones en *REEP1*, por tanto, conforman un espectro fenotípico muy similar al relacionado con las mutaciones en *BSCL2*. La edad de inicio descrita es en la infancia o adultos jóvenes (Beetz *et al.*, 2012; Toft *et al.*, 2019) y los estudios de conducciones nerviosas muestran disminución de las amplitudes motoras (Beetz *et al.*, 2012). Curiosamente se ha descrito que en los pacientes con paraparesia por mutaciones *REEP1* es frecuente la presencia de neuropatías focales (ej: síndrome de túnel del carpo, atrapamiento de nervio cubital en codo) (Toft *et al.*, 2019).

Se ha descrito un caso de neuropatía congénita grave debido a una mutación en homocigosis en *REEP1* (Schottmann *et al.*, 2015). En este caso la neuropatía se asociaba a hiperreflexia, artrogriposis y distrés respiratorio debido a parálisis diafragmática (fenotipo “*SMARD-like*”). Los estudios electrofisiológicos mostraron reducción de los PSE y ausencia de potenciales motores.

***SETX (Senataxin)***

Las mutaciones en heterocigosis en el gen *SETX* causan “NHMd con signos de motoneurona superior” y ELA de inicio juvenil (ELA tipo 4) (Chen *et al.*, 2004). Es muy probable que ambas entidades sean lo mismo, ya que el fenotipo descrito en los pacientes con un diagnóstico u otro es muy similar (Rabin *et al.*, 1999; De Jonghe *et al.*, 2002). La clínica suele debutar en la infancia o adultos jóvenes, aunque en algunos

casos es más tardía. Los pacientes presentan debilidad y atrofia muscular progresiva en extremidades de predominio distal. El curso de la enfermedad es progresivo y en los pacientes de mayor edad existe debilidad grave tanto en musculatura proximal como distal de extremidades. No hay afectación respiratoria ni bulbar, aunque en algunos casos se ha descrito debilidad facial. Los pacientes presentan piramidismo en forma de hiperreflexia, clonus y reflejo cutáneo plantar extensor. Así mismo, pueden presentar pies cavos. Los estudios electrofisiológicos muestran disminución de los CMAP, con denervación crónica de predominio en musculatura distal de extremidades y actividad muscular espontánea (Rabin *et al.*, 1999; De Jonghe *et al.*, 2002).

El gen *SETX* codifica la proteína senataxina, una helicasa ADN/ARN (Moreira *et al.*, 2004). Es una proteína nuclear que interviene en la transcripción y estabilidad genómica, ya que interacciona con varias proteínas implicadas en la regulación transcripcional y el procesamiento del pre-ARNm (Suraweera *et al.*, 2009), así como en la “eliminación” de híbridos ARN:ADN (R-loops) (Cohen *et al.*, 2018). Tiene un alto grado de homología con IGHMBP2, cuyas mutaciones causan SMARD1.

Las mutaciones bialélicas en el gen de la senataxina causan ataxia con apraxia oculomotora tipo 2 (AOA 2), un trastorno caracterizado por síndrome cerebeloso, neuropatía sensitivo-motora y apraxia oculomotora (Moreira *et al.*, 2004). Se ha sugerido que las mutaciones que producen una pérdida parcial de función o una ganancia tóxica de función podrían dar lugar a un fenotipo tipo motoneurona, mientras que las mutaciones recesivas de pérdida de función darían lugar a un fenotipo AOA 2 (Chen *et al.*, 2004; Moreira *et al.*, 2004).

### ***SIGMAR1 (Sigma nonopioid intracellular receptor-1 gene)***

Se han descrito varias familias con NHMd debido a mutaciones recesivas en *SIGMAR1* (Li *et al.*, 2015; Almendra *et al.*, 2018; Nandhagopal *et al.*, 2018). La edad de inicio de la clínica es en la infancia. Suele cursar con atrofia y debilidad grave distal de extremidades que progresa durante años para luego estabilizarse. Los pacientes tienen debilidad que predomina en musculatura extensora y evertora de tobillos y la



deformidad de pies es frecuente. Muchos pacientes presentan signos piramidales en grado variable en forma de hiperreflexia, reflejos cutáneos plantares extensores y espasticidad de miembros inferiores. En algunos pacientes predomina la espasticidad sobre la debilidad, pero el EMG muestra hallazgos que confirma la existencia de neuropatía motora (Nandhagopal *et al.*, 2018). Debido a la combinación de NHMd con espasticidad en miembros inferiores el fenotipo de algunos pacientes es clasificado como “*Silver-like*” (Horga *et al.*, 2016).

Cabe destacar que la “NHMd tipo Jerash” descrita en 1999 en varias familias de Jordania (Middleton *et al.*, 1999) está causada por la mutación c.500A>T (N167I) en homocigosis en *SIGMAR1* (Ververis *et al.*, 2020). El fenotipo de estas familias es superponible al que se ha descrito en otros pacientes con NHMd por mutaciones en este gen. Se trata de una NHMd de inicio en la primera década de vida que asocia signos piramidales en los primeros años de evolución de la enfermedad y que posteriormente pueden desaparecer quedando el cuadro definido sobre todo por debilidad y atrofia distal de extremidades. El curso de la enfermedad es catalogado como “benigno”, ya que incluso los pacientes de edad avanzada conservan la deambulación.

Las mutaciones recesivas en *SIGMAR1* también se han descrito como causa de ELA-demenia frontotemporal (Luty *et al.*, 2010; Al-Saif *et al.*, 2011; Belzil *et al.*, 2013).

La función de *SIGMAR1* no se conoce bien, pero es una proteína del retículo endoplasmático y participa en varias vías de señalización intracelular (Beijer and Baets, 2020).

### ***SLC12A6 (Solute carrier family 12 member 6)***

La familia de genes *SLC12A* codifica cotransportadores de iones K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> (KCCs) que regulan la extrusión de los iones K<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> de las células. Los KCCs participan en la homeostasis del volumen celular, el transporte epitelial y la excitabilidad neuronal. El gen *SLC12A6* se expresa en las neuronas y células gliales del SNC y periférico y codifica el KCC3 (Kahle *et al.*, 2016). Mutaciones bialélicas en *SLC12A6* causan la enfermedad conocida como “agenesia del cuerpo calloso con neuropatía periférica” (OMIM

#218000). Se ha descrito al menos un caso de NHMd causada por una mutación en heterocigosis en *SLC12A6*. Se trata de un paciente afecto de NHMd de inicio a los 9 meses de edad, con un patrón longitud-dependiente y de predominio en miembros inferiores, pero con progresión rápida a musculatura proximal con pérdida de la capacidad de la deambulación a los 8 años. El paciente no presentaba clínica sensitiva, afectación del SNC ni otros sistemas. (Kahle *et al.*, 2016). En este paciente se identificó la mutación *de novo* c.2971A>G (Thr991Ala) en *SLC12A6*. Los estudios electrofisiológicos del paciente a la edad de 7 años mostraron una disminución marcada de los CMAPs con VCM también reducidas (rango 14-31m/seg) con disminución discreta de las amplitudes sensitivas. Las alteraciones, tanto motoras como sensitivas, habían progresado en un estudio repetido a los 9 años de edad.

### ***SLC25A21 (Solute carrier family 25 member 21)***

*SLC25A21* es un transportador mitocondrial de oxodicarboxilatos. Se ha descrito un caso de NHMd grave por la mutación *missense* c.695A>G (p.Lys232Arg) en homocigosis en *SLC25A21* (Boczonadi *et al.*, 2018). Se trata de una paciente con inicio de la clínica a los 3-5 años de edad, en forma de dificultad para la marcha y caídas. El curso de la enfermedad fue progresivo, con aparición de atrofia en manos, pie caído bilateral y posterior afectación de musculatura proximal de extremidades, con necesidad de utilizar silla de ruedas a la edad de 15 años. En esta paciente además se describe hiperrefleja con clonus aquileo y disminución de la capacidad vital forzada (CVF). El estudio electrofisiológico fue compatible con un proceso neurógeno crónico y la biopsia muscular mostró atrofia neurógena con alteraciones propias de patología mitocondrial, en forma de presencia de numerosas fibras *COX-negativas* y disminución de la actividad de los complejos I y IV de la cadena respiratoria. Los niveles de CKs y la RM cerebral y medular fueron normales. Los estudios funcionales llevados a cabo por los autores les hacen concluir que 2-oxoadipato y ácido quinolínico pueden ser tóxicos para las neuronas motoras y que su acúmulo en las células podría contribuir al desarrollo de la neuropatía.

Previamente se había descrito una familia con sinpolidactilia debido a una delección en

heterocigosis en este mismo gen (Meyertholen *et al.*, 2012).

### ***SLC5A7 (Solute Carrier Family 5 Member 7)***

El gen *SLC5A7* codifica el transportador de colina de alta afinidad (CHT) dependiente de sodio localizado en la presinapsis, donde juega un papel fundamental en la síntesis y liberación de acetilcolina en la unión neuromuscular (UNM) (Barwick *et al.*, 2012). En 2012, Barwick *et al.* identificaron la mutación c.1497delG en *SLC5A7* en una familia con NHMd asociada a paresia de cuerdas vocales y herencia AD (Barwick *et al.*, 2012), correspondiente a la NHMd tipo VII de la clasificación de Harding (Harding, 2005). El fenotipo clínico de esta familia se había descrito en detalle previamente (Pridmore *et al.*, 1992; McEntagart *et al.*, 2001) y era idéntico al de otra familia galesa descrita con anterioridad (Young and Harper, 1980) cuyo origen común se estableció posteriormente (McEntagart *et al.*, 2001). El inicio de la clínica era típicamente en la segunda década de vida con debilidad y atrofia de los músculos intrínsecos de las manos y posteriormente de la musculatura distal de miembros inferiores. La mayoría de pacientes presentaba disfonía a causa de paresia unilateral o bilateral de cuerdas vocales y no existía afectación sensitiva. El curso de la enfermedad era lentamente progresivo, con una esperanza de vida normal. En cuanto a los estudios electrofisiológicos, las conducciones nerviosas fueron normales y el EMG mostraba denervación crónica.

Posteriormente se han descrito otras familias afectas de NHMd por diferentes mutaciones en heterocigosis en *SLC5A7* (Ingram *et al.*, 2016; Hamanaka *et al.*, 2018; Salter *et al.*, 2018). Se trata, en todos los casos, de mutaciones que darían lugar a una proteína truncada. Todos los pacientes presentan un fenotipo muy similar, si bien alguno de los casos descritos no presenta paresia de cuerdas vocales (Salter *et al.*, 2018). Por otro lado, mutaciones bialélicas en el gen *SLC5A7* dan lugar a un síndrome miasténico congénito de gravedad variable (Bauché *et al.*, 2016).

***SORD (sorbitol dehydrogenase)***

Las mutaciones bialélicas en el gen de la sorbitol deshidrogenasa (*SORD*) son una causa frecuente de CMT2 y NHMd descubierta recientemente (Cortese *et al.*, 2020b). En el artículo donde se describe por primera vez, Cortese *et al.* exponen las características de 45 pacientes pertenecientes a 38 familias independientes. El fenotipo descrito es el clásico de una neuropatía hereditaria del grupo CMT, con una debilidad distal de extremidades de predominio en miembros inferiores, siendo poco frecuente la presencia de debilidad en musculatura proximal. En los pacientes analizados, la edad media de inicio de los síntomas fue de  $17 \pm 8$  años y el síntoma de debut más frecuente fue la dificultad para caminar. Dos tercios de los pacientes presentaban deformidad de pies. Los síntomas motores estaban presentes en todos los casos y los sensitivos solo en la mitad. Sin embargo, la mayoría de pacientes fueron diagnosticados de CMT2 (51%, n=23), seguido de NHMd en un 40% de casos (n=18) y por último de CMT intermedio en un 9% de casos (n=4). Es decir, como ocurre con otros genes, las mutaciones en *SORD* podrían dar lugar tanto a fenotipo CMT2 como NHMd, aunque incluso en los casos en los que existe afectación sensitiva, predomina la clínica motora. Los estudios electrofisiológicos de los pacientes mostraron la existencia de una neuropatía motora axonal en todos los casos, con velocidades reducidas en 26% de los casos (VCM en miembros superiores en rango 32-42 m/seg) y PSE reducidos o ausentes en 26% de los pacientes.

Todos los pacientes descritos hasta el momento presentan la mutación c.757delG (p.Ala253GlnfsTer27) en homocigosis o en heterocigosis compuesta con otro segundo cambio. De hecho, los autores calculan que la frecuencia de la variante p.Ala253GlnfsTer27 en población control sería del 0.004 y por tanto, estiman que la prevalencia de la neuropatía asociada a *SORD* simplemente teniendo en cuenta los casos debidos a la mutación p.Ala253GlnfsTer27 en homocigosis sería entorno al 1/100.000 habitantes, lo que convertiría a este cambio en concreto en la variante patogénica en estado bialélico más frecuente en las neuropatías hereditarias (Cortese *et al.*, 2020b). En cuanto al hecho de por qué siendo una causa tan frecuente de neuropatía hereditaria, no se hubiera identificado anteriormente, se hipotetiza que es debido a la existencia de *SORD2P*, una parálogo del gen *SORD*, que interferiría con el

proceso de análisis utilizado en las técnicas de secuenciación de nueva generación. Destaca el hecho que la variante c.757delG (p.Ala253GlnfsTer27) en el exón 7 de *SORD* está presente en *SORD2P* en más del 95% de cromosomas de control.

Se postula que la pérdida de función de la enzima SORD y el consecuente acúmulo de sorbitol que se produce en las células sería el responsable de la neuropatía, aunque el mecanismo exacto a través del cual el acúmulo de sorbitol en las células daría lugar a la degeneración de los axones periféricos no se conoce.

### ***SPTAN1 (alpha-II spectrin)***

En tres familias independientes afectas de NHMd de herencia AD, Beijer et al. (Beijer et al., 2019) identificaron mutaciones *nonsense* en heterocigosis en *SPTAN1*. El fenotipo de las familias era el de una neuropatía motora longitud-dependiente de inicio en la infancia o juventud (rango 6-30 años) y de curso estático o lentamente progresivo con debilidad distal en extremidades inferiores y, en algún caso aislado, también distal en miembros superiores. Como curiosidad, entre los individuos portadores de las mutaciones estudiadas habría al menos dos portadores asintomáticos en dos familias diferentes, ambos pertenecientes a generaciones anteriores a las de otros familiares afectados, por lo que los autores sugieren la existencia de una penetrancia incompleta. Por otro lado, Beijer et al. demostraron que la expresión de alfa-espectrina estaba reducida en los linfoblastos de los pacientes respecto a los controles.

El gen *SPTAN1* codifica la proteína espectrina alfa II, que forma parte del citoesqueleto submembranoso de los axones, necesario para su resistencia a las fuerzas mecánicas a las que se puedan ver sometidos. La espectrina alfa II también juega un papel importante en la estructura de los nodos de Ranvier (Huang et al., 2017).

Las mutaciones en heterocigosis en el gen *SPTAN1* se han descrito previamente en encefalopatías infantiles, asociadas o no a epilepsia. En estos casos, se trata de mutaciones *de novo* tipo missense, deleciones y duplicaciones *in-frame* o mutaciones de *splicing* y *nonsense* (Syrbe et al., 2017; Gartner et al., 2018). Las mutaciones

bialélicas en *SPTAN1* también se han implicado en paraparesia espástica hereditaria (Leveille et al., 2019).

### ***SYT2 (synaptotagmin-2)***

En 2014, se identificaron dos mutaciones dominantes *missense* en *SYT2* en dos familias afectas de neuropatía motora y alteración presináptica de la unión neuromuscular (UNM) (Herrmann *et al.*, 2014). En estas familias la clínica se inició en la infancia y los pacientes presentaba deformidad de pies, debilidad de extremidades de predominio distal y miembros inferiores, ausencia o disminución de reflejos y alteración de la marcha. En ambas familias existían datos clínicos sugestivos de afectación de la UNM en forma de fatigabilidad muscular, fenómeno de facilitación de los reflejos e incluso diplopía y ptosis fatigable en una de ellas (Whittaker *et al.*, 2015). Los estudios electrofisiológicos demostraron normalidad de las respuestas sensitivas con disminución de los CMAPs y datos compatibles con una afectación presináptica de la UNM, en concreto los autores describen un decremento > 10% de los CMAPs con la estimulación repetitiva a bajas frecuencias así como un incremento significativo tras una contracción máxima voluntaria de 10 segundos que se mantenía hasta 60 min después. En una de las familias el estudio EMG de los músculos con debilidad fue normal, mientras que en la otra existía denervación crónica (Herrmann *et al.*, 2014; Whittaker *et al.*, 2015). Siendo estrictos, por tanto, una de la familias presentaría una afectación aislada de la UNM, y la otra una combinación de afectación de la UNM con neuropatía motora, aunque en ambos casos el fenotipo clínico era muy similar. Cabe resaltar, además, que en una de estas familias la clínica mejoró parcialmente tras tratamiento con 3,4-diaminopiridina (Whittaker *et al.*, 2015).

Posteriormente se ha descrito otra familia con neuropatía motora y afectación presináptica de la UNM por una nueva mutación en heterocigosis en *SYT2* (Montes-Chinea *et al.*, 2018). La clínica y hallazgos electrofisiológicos en este caso son superponibles los descritos previamente, aunque hay que destacar que en el probando de esta última familia el EMG mostró datos de denervación aguda y crónica en los músculos gemelos mediales.

La sinaptotagmina-2 es una proteína que se localiza en las vesículas sinápticas y que funciona como un “sensor de calcio” (Herrmann *et al.*, 2014). Las tres mutaciones encontradas en estas familias se localizan en el dominio C2B de la proteína, lugar de unión de la misma al calcio. Los estudios funcionales indican que las mutaciones en *SYT2* tienen un efecto dominante que produce una alteración en la exocitosis de las vesículas sinápticas (Herrmann *et al.*, 2014; Montes-Chinea *et al.*, 2018).

#### ***TRPV4 (transient receptor potential vanilloid cation channel 4)***

TRPV4 es un canal iónico que regula el flujo de calcio en respuesta a estímulos mecánicos y osmóticos (Lorenzo *et al.*, 2008). Las mutaciones en heterocigosis en *TRPV4* causan varios fenotipos que incluyen CMT2C, atrofia muscular espinal escapuloperoneal y atrofia muscular espinal congénita con artrogriposis (Auer-Grumbach *et al.*, 2010; Deng *et al.*, 2010; Landouré *et al.*, 2010; McEntagart, 2012). Es frecuente que los pacientes asocien paresia de cuerdas vocales y sordera neurosensorial. Las mutaciones en *TRPV4* también dar lugar a displasias óseas, en ocasiones en combinación con neuropatía periférica (Evangelista *et al.*, 2015).

En el caso del fenotipo “atrofia muscular espinal distal congénita con artrogriposis/contracturas” el cuadro se caracteriza por deformidad de pies y contracturas articulares junto con debilidad y atrofia restringida a miembros inferiores de curso no progresivo (Fleury and Hagemant, 1985).

En la “atrofia muscular espinal escapuloperoneal” el inicio de la clínica suele ser en la infancia temprana. Los pacientes presentan debilidad y atrofia de predominio en musculatura escapular y además pueden presentar alguno de los siguientes rasgos: ausencia congénita de músculos, paresia de cuerdas vocales, debilidad facial, debilidad de músculo recto externo (nervio abducens), debilidad en flexores de cuellos y debilidad proximal y distal de extremidades de curso progresivo. También son frecuentes las deformidades de pies. El grado de afectación puede variar notablemente de unos pacientes a otros y los estudios electrofisiológicos son característicos de un proceso neurógeno crónico (DeLong and Siddique, 1992).

Algunas familias con mutaciones en *TRPV4* son diagnosticadas de CMT2C ya que los pacientes presentan una debilidad y atrofia de predominio distal junto con alteración

sensitiva en el examen neurológico. Es característica la presencia de paresia de cuerdas vocales y afectación de musculatura respiratoria (debilidad diafragmática y de músculos intercostales). La edad de inicio es muy variable y al igual que en los casos anteriores, la gravedad clínica también (Dyck *et al.*, 1994).

En los últimos años se han descrito varias familias con diferentes mutaciones en *TRPV4*. A los tres fenotipos anteriormente descritos asociados a *TRPV4* se ha añadido el de “NHMd con paresia de cuerdas vocales”. En cualquier caso, existe un solapamiento entre todos los fenotipos y además dentro de una misma familia pueden co-existir varios de ellos (Zimoń *et al.*, 2010).

### ***VRK1 (vaccinia-related kinase 1)***

Las mutaciones recesivas en *VRK1* se identificaron inicialmente como causa de atrofia muscular espinal asociada a hipoplasia pontocerebelosa, un cuadro grave de inicio congénito en el que existe microcefalia, retraso psicomotor, debilidad y atrofia muscular y ataxia. El curso de la enfermedad es progresivo y las pacientes mueren a una edad temprana (Renbaum *et al.*, 2009). También se han descrito casos similares en los que la neuropatía es sensitivo-motora (Gonzaga-Jauregui *et al.*, 2013).

Posteriormente, se han descrito varios pacientes afectados de NHMd por mutaciones recesivas en *VRK1* que no presentan microcefalia ni hipoplasia pontocerebelosa (Stoll *et al.*, 2016; Feng *et al.*, 2019, Li *et al.*, 2019b). Muchos de estos pacientes inician la clínica en la adolescencia y presentan una debilidad de predominio distal de curso progresivo, en algunos casos con posterior afectación de musculatura proximal de extremidades (Li *et al.*, 2019b). Algunos de estos pacientes presentan afectación de primera motoneurona en forma de reflejos exaltados o tiempo de conducción motora central alargado (Stoll *et al.*, 2016). De hecho, algunos pacientes son diagnosticados de ELA (Nguyen *et al.*, 2015; Stoll *et al.*, 2016), aunque prestando atención a lo descrito por los autores el fenotipo de estos pacientes puede englobarse en alguno de los mencionados anteriormente (NHMd con reflejos exaltados, neuropatía periférica grave progresiva con afectación bulbar y microcefalia). También se han descrito algunos casos con fenotipo de NHMd de inicio en la edad adulta, concretamente en la quinta década de vida, sin afectación de primera motoneurona ni anomalías en RM cerebral



(Greenbaum *et al.*, 2020).

En resumen, las mutaciones recesivas en *VRK1* dan lugar a un espectro clínico que incluye desde síndromes graves de inicio congénito hasta NHMd de fenotipo clásico de inicio en la edad adulta. *VRK1* codifica una quinasa que se ha implicado en la proliferación y migración neuronal embrionaria, en la regulación del ciclo celular, reparación de ADN y procesamiento de ARN (Stoll *et al.*, 2016). Se ha comprobado que las mutaciones en *VRK1* impiden que la proteína fosforile varios de sus sustratos, que incluyen proteínas fundamentales en la formación de los cuerpos de Cajal como la coilina (Marcos *et al.*, 2020), que así mismo interacciona con SMN1 (Hebert *et al.*, 2001).

### ***VWA1 (von Willebrand factor A domain containing 1)***

Recientemente se han identificado las mutaciones en el gen *VWA1* como causa de neuropatía motora hereditaria de herencia recesiva (Pagnamenta *et al.*, 2021). En concreto, los autores del trabajo identificaron 15 pacientes pertenecientes a 10 familias diferentes con mutaciones bialélicas en *VWA1*. Todas las familias compartían una mutación en común, una inserción de 10 pares de bases (c.62\_71dup10;p.G25Rfs\*74, NM\_022834.5) en el exón 1 del gen. En siete familias, esta variante se encontró en homocigosis, mientras que en las otras tres esta mutación se encontraba en estado heterocigoto junto a una variante de nucleótido único (*SNV*). *El estudio de haplotipos apunta a que p.G25Rfs\*74 es una mutación fundadora en la población europea.*

*VW1* codifica una proteína de la matriz extracelular denominada von Willebrand factor A domain related protein (WARP). La proteína WARP probablemente interacciona con perlecán y el colágeno VI y en el modelo animal (pez cebra) knock-out para *VWA1* existen alteraciones en el crecimiento de las motoneuronas y sus axones. En cuanto al cuadro clínico, éste se caracteriza por ser de inicio en la infancia (alrededor de los 2 años de edad), existiendo en algunos casos retraso en el inicio de la marcha. Existe debilidad de claro predominio en miembros inferiores, que no presenta un patrón longitud-dependiente: en algunos casos predomina la debilidad distal, pero en otros casos la debilidad proximal es similar o mayor que la distal. Muchos de los pacientes

asocian deformidad de pies y también es frecuente la presencia de contracturas articulares e hiperlordosis lumbar. El curso es muy lentamente progresivo. El estudio electrofisiológico muestra hallazgos típicos de una neuropatía motora axonal y en la RM muscular la infiltración grasa predomina en vasto lateral y el compartimento anterior de piernas.

### ***WARS1 (cytoplasmic tryptophanyl-tRNA synthetase, TrpRS, gene)***

Inicialmente se identificó la mutación c.770A4G (p.His257Arg) en *WARS1* en tres familias independientes, dos taiwanesas y una belga, afectas de NHMd de herencia AD (Tsai *et al.*, 2017). La clínica de los pacientes se puede englobar dentro de una NHMd “típica”, con un inicio juvenil (sobre los 10-13 años de edad), progresión lenta y debilidad de predominio distal en extremidades. La debilidad comienza en miembros inferiores y se sigue de debilidad en manos. La mayoría de pacientes conservan una marcha independiente y es frecuente la presencia de pies cavos. Posteriormente se han descrito otros pacientes afectados de NHMd por diferentes mutaciones en *WARS1* con fenotipos muy similares (Li *et al.*, 2019a; Wang *et al.*, 2019), si bien en la familia descrita por Wang *et al.*, el inicio de la clínica es algo posterior (15-23 años).

El gen *WARS1* codifica la tryptophanyl-tRNA, una enzima que “carga” las moléculas de tRNA con el aminoácido triptófano. Los estudios funcionales apuntan a que las mutaciones descritas reducen la actividad o la expresión de la enzima resultando en una reducción en la síntesis de proteínas y en el crecimiento de las neuritas (Tsai *et al.*, 2017, Li *et al.*, 2019a; Wang *et al.*, 2019).

### **Otros genes propuestos: *TDRKH (Tudor and KH domains-containing protein)***

En 2018, se identificó la variante *missense* c.851G>A (p.Arg284His) en *TDRKH* en una familia afecta de una forma atípica de NHMd (Miura *et al.*, 2019). En esta familia existía una herencia AD y el fenotipo consistía en una combinación de atrofia y debilidad distal en músculos extensores de extremidades inferiores con debilidad facial

bilateral, debilidad en la flexión cervical y arreflexia. El inicio fue en edad adulta (37 y 51 años respectivamente en los dos casos descritos) en forma de dificultad para la marcha. No existía afectación sensitiva y el estudio electrofisiológico mostró disminución selectiva del CMAP del nervio peroneo, con normalidad del resto de conducciones motoras y sensitivas y disminución de la duración de los PUMs en el EMG. Mediante estudio exoma los autores identificaron el cambio c.851G>A en *TDRKH*, este cambio está en el denominado dominio tudor de la proteína, que está presente también en la proteína Survival Motor Neuron, codificada por el gen *SMN1*, relacionada con AME.

La proteína Tdrkh está implicada en el metabolismo del ARN y espermatogénesis (Saxe *et al.*, 2013).



# **JUSTIFICACIÓN**



Las NHMd son enfermedades degenerativas de origen genético que afectan a gente joven y producen una discapacidad importante. A día de hoy no disponemos de un tratamiento que modifique el curso de la enfermedad, por lo que los esfuerzos en investigación en este grupo de enfermedades son muy importantes. La historia natural de muchas de formas de NHMd no se conoce aún muy bien, en parte por ser enfermedades raras, lo que hace difícil concentrar muchos pacientes en seguimiento en un mismo centro. Solo se han descrito un número reducido de series de pacientes afectados de NHMd, por lo que su prevalencia y distribución genética en las diferentes poblaciones no se conoce. Uno de los retos de las NHMd es que existe una gran variabilidad genética y cada gen es responsable de un porcentaje pequeño de casos por lo que, salvo en algunas excepciones, el estudio genético no se puede realizar de forma dirigida a un gen candidato y se requiere de técnicas de nueva generación (NGS) como el estudio mediante panel de genes o exoma. A pesar de ello, hoy en día solo el 15-30% de pacientes afectados de NHMd son diagnosticados desde un punto de vista genético.

La gran variabilidad genética que existe en las NHMd es una fuente de información que permite explorar los diferentes procesos celulares que son importantes para el mantenimiento de las neuronas y sus axones. La identificación de nuevos genes está aportando información sobre los procesos moleculares que llevan a la degeneración axonal y está quedando patente que existe un claro solapamiento a nivel clínico y molecular con otras enfermedades neurodegenerativas, como por ejemplo, la ELA. Es importante comprender la patogenia molecular de las NHMd para poder diseñar potenciales estrategias de tratamiento en el futuro.





# **HIPÓTESIS DE TRABAJO**



El fenotipo clínico y la historia natural de los pacientes afectos de NHMd no se conoce bien debido a que estas enfermedades son poco frecuentes, el diagnóstico genético es dificultoso y en muchos casos no se realiza una valoración clínica a fondo ni un seguimiento de los pacientes a largo plazo.

Nuestra hipótesis es que la valoración fenotípica cuidadosa de una serie amplia de pacientes de NHMd evaluados en el Hospital Universitari i Politècnic La Fe (centro de referencia para esta patología en la Comunidad Valenciana y España) junto con el estudio genético que incluye tecnologías de secuenciación de nueva generación (panel de genes y exoma) posibilitará:

- Conocer la prevalencia mínima de las NHMd y sus diferentes causas genéticas en nuestra población.
- Estudiar el fenotipo y la historia natural de los pacientes afectos de NHMd.
- Elaborar algoritmos de decisión que indiquen los genes a estudiar según el fenotipo clínico.



# **OBJETIVOS**



## Objetivo general.

El objetivo principal es caracterizar nuestra serie clínica de pacientes y familias con NHMd en profundidad, definiendo el fenotipo clínico y la historia natural, y determinando las causas genéticas responsables de la enfermedad en cada paciente.

## Objetivos específicos.

- 1) Caracterización clínica de una serie de pacientes: datos clínicos, datos electrofisiológicos y datos de RM.
- 2) Caracterización genética de una serie de pacientes y compararla con otras series publicadas.
- 3) Estudios epidemiológicos: estudiar la prevalencia de cada mutación en la Comunidad Valenciana e identificar posibles “clusters” geográficos de cada mutación.
- 4) Estudiar correlaciones fenotipo-genotipo:
  - Reconocer la penetrancia de las diferentes mutaciones.
  - Estudiar la historia natural de las diferentes mutaciones.
  - Analizar la frecuencia de los patrones de herencia y el porcentaje de casos aparentemente esporádicos que son mutaciones *de novo*.
  - Conocer el solapamiento con otras formas de axonopatías distales que presenten afectación sensitiva y motora (CMT2) y con otras neuropatías hereditarias motoras (atrofias espinales del adulto y ELA juvenil).





# **METODOLOGÍA**



## Población

Se incluyeron los pacientes con diagnóstico de NHMd (pacientes afectados de neuropatías hereditarias tipo CMT en los que no existe afectación sensitiva en los estudios electrofisiológicos) pertenecientes a la serie de neuropatías hereditarias del HUIP LaFe evaluados durante el período 1990 -2019.

Se consideró que los pacientes estaban afectados de una NHMd si presentaban una neuropatía motora que cumplía al menos alguna de las siguientes características:

- Historia natural, clínica y neurofisiología compatible con NHMd
- Identificación del defecto genético causal
- Otros familiares afectados

Se incluyeron únicamente los pacientes a los que se pudo valorar mediante protocolo clínico estandarizado y realizar estudio genético. Todos los pacientes incluidos firmaron consentimiento informado para la introducción de datos clínicos en una base de datos de neuropatías hereditarias y para realización de estudios genéticos. Así mismo, con la finalidad de determinar con seguridad el modo de herencia en las diferentes familias y realizar los estudios genéticos se incluyeron los familiares sanos y afectados de los probandos que dieron su consentimiento informado con tal fin.

## Selección de variables clínicas

Se recogieron variables de tanto de forma retrospectiva como prospectiva. La recogida retrospectiva de variables se realizó mediante la revisión de las notas médicas derivadas de cada atención, registradas en el sistema de información clínico-asistencial hospitalario (programa Orion Clinic).

A todos los pacientes se les realizó de forma sistemática un protocolo que incluye los siguientes datos:

- 1) Demográficos del paciente incluida edad, lugar de residencia y lugar de nacimiento de paciente, padres y abuelos.

II) Genéticos: árbol genealógico, clasificando a los pacientes de acuerdo al tipo de herencia en: a) transmisión autosómica dominante; b) autosómica recesiva; c) ligada al cromosoma X; y d) casos esporádicos.

III) Clínicos: se realiza un cuestionario clínico sistemático para recoger datos de la historia personal, en el examen se evalúa el balance muscular, atrofia, sensibilidad, reflejos, deformidad de pies y examen neurológico general para valorar la existencia de afectación de otros sistemas.

La fuerza se gradúa según la escala del Medical Research Council (MRC). Como escala de discapacidad se aplicará la segunda versión de la escala neuropática validada para CMT (CMTNS2) que incluye signos y síntomas debido a neuropatía, afectación funcional y estudios electrofisiológicos (Murphy *et al.*, 2011).

La valoración clínica se repite anualmente. El análisis de la progresión de la enfermedad en el tiempo se realiza valorando cambios en la escala CMTNS2.

IV) Electrofisiológicos: los estudios de conducción nerviosa se realizan con técnicas estándar (Sevilla *et al.*, 2003)

VII) RM muscular: Se realiza en extremidades inferiores según protocolo (Gallardo *et al.*, 2006) e incluye secuencias T1 y STIR (o T2 fat sat) en al menos un plano, y una secuencia T1 fat-sat antes y después de la inyección de contraste paramagnético. Se analiza la existencia de infiltración grasa de los músculos, su grado y patrón de distribución.

## Estudios genéticos

Los estudios genéticos e informáticos de los pacientes se han realizado en colaboración con la Dra. Carmen Espinós y el Dr. Vincenzo Lupo de la Unidad de Genética y Genómica de Enfermedades Neuromusculares y Neurodegenerativas del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF) en el marco de varios proyectos de investigación. El protocolo utilizado para el estudio genético ha ido evolucionando a medida que han aparecido nuevas técnicas de secuenciación masiva. En cualquier

caso, el ADN de cada uno de los pacientes y sus familiares se extrajo de sangre periférica mediante métodos estándar tras la firma de un consentimiento informado para el estudio genético. Algunos de los pacientes se diagnosticaron mediante secuenciación Sanger. El resto se estudió mediante WES o mediante paneles de genes específicamente diseñados que incluyen la mayoría de genes asociados a enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT), neuropatía motora hereditaria distal (NHMd), esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y atrofia muscular espinal (AME). La secuenciación de exomas se realizó en el Centro Nacional de Análisis Genómico (CNAG), Barcelona, y el análisis bioinformático en la plataforma de colaboración RD-Connect, donde también se realizó el filtrado de variantes.

## Aspectos éticos

Los pacientes incluidos en este trabajo se han estudiado dentro de varios proyectos de investigación como “*Treat-CMT*” o “*Estudio Mutacional de una Serie de Pacientes con Neuropatía Hereditaria Motora Distal*”. Los pacientes incluidos prospectivamente se han estudiado dentro del proyecto “*Espectro genético e historia natural de las neuropatías hereditarias motoras distales*”, que consta del mismo protocolo y metodología que el trabajo actual y contó con la aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica del HUIP La Fe (número de proyecto 2015/0085, fecha de aprobación 8 de septiembre de 2015).



# **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**





**Artículo 1: Distal hereditary motor neuropathies: Mutation spectrum and genotype-phenotype correlation.**

Frasquet M, Rojas-García R, Argente-Escrig H, Vázquez-Costa JF, Muelas N, Vílchez JJ, Sivera R, Millet E, Barreiro M, Díaz-Manera J, Turon-Sans J, Cortés-Vicente E, Querol L, Ramírez-Jiménez L, Martínez-Rubio D, Sánchez-Monteagudo A, Espinós C, Sevilla T, Lupo V.

Eur J Neurol. 2021 Apr;28(4):1334-1343. doi: 10.1111/ene.14700. Epub 2021 Jan 10.

En este artículo se estudia el espectro clínico y genético de una serie de 163 pacientes diagnosticados de NHMd procedentes dos centros de referencia españoles: el Hospital Universitari i Politècnic La Fe (HUIP La Fe) (Valencia) y el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona). El trabajo permite estudiar una de las series más amplias de NHMd publicadas hasta ahora, conocer la distribución la epidemiología genética de las NHMd en nuestro entorno y al mismo tiempo analizar las diferencias entre nuestra serie y otras series publicadas.

En Valencia se identificaron y estudiaron 127 pacientes (77 familias) y en Barcelona 36 pacientes (31 familias). Todos los pacientes, excepto aquellos que ya habían sido previamente diagnosticados mediante Sanger, se estudiaron mediante secuenciación de exoma completo (WES) y/o mediante varias versiones de paneles de genes para el estudio de neuropatías genéticas. Los paneles incluían la mayoría de genes relacionados con NHMd/CMT y también varios genes relacionados con ELA familiar como *TARDP*, *FUS*, *SOD*, *VCP*, *VAPB* y *HNRNPA1*. En aquellos pacientes catalogados como esporádicos o con una herencia AR en los que no se consiguió un diagnóstico genético tras panel de genes o WES se estudió el gen *SORD* (Cortese *et al.*, 2020b).

Puesto que todos los pacientes incluidos en el HUIP La Fe procedían de la Comunidad Valenciana se pudo calcular una prevalencia mínima de las NHMd en esta región de 2.28 por 100.000 habitantes, muy similar a la prevalencia recientemente calculada en el Norte de Inglaterra (Bansagi *et al.*, 2017). La mayoría de probandos fueron casos esporádicos (62.3%) y el rango de edad de debut de los síntomas más habitual fue entre los 2 y 10 años. La tasa global de diagnóstico genético fue del 47,8% (78/163) pacientes y 34,2% (37/108) de las familias y difirió de forma notable entre los pacientes con historia familiar positiva (67.4%) y los que eran casos esporádicos (12.3%). Estos resultados son similares a los obtenidos en series recientes de pacientes con NHMd estudiados mediante técnicas NGS (Bansagi *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2020) y ponen de manifiesto que la mayoría de los pacientes afectados de NHMd no son diagnosticados genéticamente tras estudios exhaustivos. Esto presumiblemente se deba a que en muchos casos las NHMd se deben a mutaciones en genes “no conocidos”, mutaciones en regiones no codificantes o reordenamientos genómicos complejos (Pipis *et al.*, 2019; Pagnamenta *et al.*, 2021).

En Valencia, en 79,4% (50/63) de los pacientes diagnosticados genéticamente la NHMd estaba causada por mutaciones en un número reducido de genes (*GARS1*, *HSPB1*, *BICD2* y *DNAJB2*) y en Barcelona en 66,7% de los pacientes con diagnóstico la enfermedad se encontraron mutaciones en *HSPB1*, *AAAS*, *BICD2* y *DNAJB2*. En la serie global se identificaron mutaciones bialélicas en *SORD* en 5 pacientes (3,1%) procedentes de 3 familias. Por tanto, varios genes causantes de NHMd fueron comunes en ambos centros: *AAAS*, *BICD2*, *HSPB1*, *DNAJB2* y *SORD*. Cabe destacar que en estos genes solo se encontraron variantes comunes en *SORD* y en *HSPB1*. La frecuencia de mutaciones en *SORD* en nuestra población no fue tan alta como la esperada (Cortese *et al.*, 2020b), pero probablemente se deba a que en este trabajo solo se han estudiado probandos con diagnóstico de NHMd y no de CMT2, a diferencia de las cohortes originalmente descritas que incluían tanto pacientes con NHMd como CMT2 (Cortese *et al.*, 2020b).

La causa genética más frecuente de NHMd en la serie global fueron las mutaciones en *HSPB1* (10.4% de pacientes) en concordancia con otras series de NHMd publicadas previamente que muestran que las mutaciones en este gen son una causa relativamente frecuente de NHMd (Dierick *et al.*, 2008; Capponi *et al.*, 2011). Otro dato a resaltar es que todos pacientes del HUIP La Fe presentaban el cambio c.418C>G (p.Arg140Gly) y procedían de una misma área geográfica. Además, algunos presentaban exclusivamente afectación motora (NHMd) y en cambio otros afectación sensitivo-motora (CMT2).

Entre los otros genes comunes se encuentran *AAAS* y *DNAJB2*, ambos causantes de cuadros neurológicos de herencia AR. Las mutaciones bialélicas en el gen *AAAS* causan el “síndrome triple A” o “síndrome de Allgrove”, que se caracteriza por acalasia, alacrimia e insuficiencia suprarrenal (Allgrove *et al.*, 1978), pero también puede asociar una neuropatía periférica de predominio motor. Las mutaciones bialélicas en *DNAJB2* dan lugar a NHMd de curso progresivo y grave. La alta frecuencia de casos debidos a mutaciones en estos dos genes en nuestra serie puede deberse en parte a que en nuestra población hay una alta proporción de consanguinidad (Sivera *et al.*, 2013) ya que en todos los pacientes las mutaciones encontradas en *AAAS* y *DNAJB2* estaban en homocigosis.

Otro dato llamativo es que en la cohorte del HUIP La Fe se identificó el cambio c.65A>G (p.Glu22Gly) en el gen *SOD1* en dos probandos afectados de NHMd grave. Este cambio se ha descrito previamente como causa de ELA con afectación predominante de miembros inferiores y un tiempo de supervivencia largo (Syriani *et al.*, 2009). Estos resultados dejan patente el solapamiento clínico y genético que existe entre las NHMd y las ELA. Por otro lado, no se identificaron mutaciones patogénicas en el resto de genes asociados a ELA que fueron estudiados.

Por último, es necesario enfatizar que en un 34.2% (37/108) de casos índices se identificaron variantes genéticas inicialmente clasificadas como “variantes de significado incierto” (VUS, del inglés *variant of uncertain significance*). Los estudios de segregación familiar permitieron la reclasificación de las VUS identificadas a “variantes probablemente benignas” en un 54% de las familias, lo cual pone de manifiesto la importancia de llevar a cabo los estudios de segregación siempre que sea posible.

## Artículo 2: Clinical spectrum of *BICD2* mutations

M Frasquet , A Camacho , R Vílchez , H Argente-Escrig , E Millet , J F Vázquez-Costa, R Silla, A Sánchez-Monteagudo , J J Vílchez , C Espinós , V Lupo # , T Sevilla #

# Igual contribución

Eur J Neurol. 2020 Jul;27(7):1327-1335. doi: 10.1111/ene.14173. Epub 2020 Mar 16.

En este artículo describimos la genética y el fenotipo de 11 pacientes diagnosticados de neuropatías hereditarias por mutaciones en el gen *BICD2*. Los pacientes estudiados pertenecen a 5 familias diferentes, 4 de ellas de la cohorte del HUIP La Fe, y la quinta de ellas procedente del Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid). En total, en las 5 familias se identificaron 4 mutaciones diferentes en heterocigosis en *BICD2*. Destacar en este sentido que describimos dos nuevas mutaciones patogénicas en *BICD2*, c.1669T>C y c.1454T>G, confirmamos el papel patogénico de la variante c.2042C>T y el hecho de que c.320C>T (p.Ser107Leu) sea una mutación “hot-spot”, como se ha sugerido previamente (Bansagi *et al.*, 2015b, Rossor *et al.*, 2015b).

El fenotipo de nuestros pacientes se caracterizó principalmente por debilidad de extremidades inferiores en combinación con deformidad de pies, en línea con el cuadro clínico clásico asociado a las mutaciones en *BICD2*. Sin embargo, existió una variabilidad clínica importante. Mientras que algunos pacientes presentaban una afectación funcional importante por la enfermedad, otros eran prácticamente asintomáticos, presentando como único síntoma deformidad de pies. Sin embargo, en todos los pacientes, incluso en los que no presentaban debilidad muscular, los estudios electrofisiológicos y la RM muscular presentaba alteraciones. Este hecho destaca la importancia de una valoración clínica cuidadosa para detectar alteraciones leves y la utilidad de las pruebas complementarias a la hora de valorar a los pacientes.

En cuanto a los hallazgos de RM muscular de los pacientes, ésta mostraba un patrón de afectación muscular típico en muslos y piernas, como se ha descrito previamente (Rossor *et al.*, 2015b). En este estudio, como novedad, hemos incluido también imágenes de RM muscular a nivel de pelvis y pies. Hemos podido observar que a nivel de pelvis existe una afectación selectiva de los músculos glúteo medio y mínimo. Por otro lado, solo se observó infiltración grasa de la musculatura de pies en dos pacientes, uno de ellos asintomático. Esto demuestra que la enfermedad no sigue un patrón longitud-dependiente y que la deformidad de pies presente en enfermedades neuromusculares hereditarias no siempre se acompaña de atrofia o infiltración grasa de la musculatura de pies.

Por último, investigamos la existencia de afectación sensitiva en la enfermedad. Hasta el momento, se ha descrito que los pacientes con mutaciones en *BICD2* pueden presentar síntomas y signos sensitivos leves, pero con respuestas sensitivas normales en los estudios de conducción nerviosa (Rossor *et al.*, 2015b). Uno de nuestros pacientes presentaba síntomas sensitivos y alteración de las respuestas sensitivas en los estudios de conducción nerviosa, por lo que podríamos catalogarlo como CMT2, aunque hay varios factores a tener en cuenta como el hecho de que este paciente fue diagnosticado de diabetes mellitus y que presentaba edema en miembros inferiores, lo cual puede haber interferido en los estudios electrofisiológicos. La mutación de este paciente, c.2042C>T, se ha descrito previamente en un paciente diagnosticado de CMT2 (Bacquet *et al.*, 2018), por lo que es posible que esta mutación en concreto se asocie a la existencia de afectación sensitiva. Adicionalmente, otros dos pacientes presentaban alteraciones sensitivas leves en el examen clínico, pero sin presentar síntomas y sin alteraciones en las pruebas de conducción nerviosa periférica ni en los potenciales evocados somatosensoriales. En uno de estos pacientes realizamos biopsia de piel proximal y distal en miembros inferiores para estudiar la densidad de fibras nerviosas intraepidérmicas y los resultados mostraron una reducción que seguía un patrón longitud-dependiente. En cambio, en su hija afecta los resultados fueron normales tanto a nivel proximal como distal. Estos resultados plantean la posibilidad de que en los pacientes con mutaciones en *BICD2* exista una neuropatía de fibra fina que explique los síntomas sensitivos.





### **Artículo 3: Phenotype and natural history of inherited neuropathies caused by HSJ1 c.352+1G>A mutation**

M Frasquet , M J Chumillas , J J Vílchez , C Márquez-Infante , F Palau , J F Vázquez-Costa , V Lupo , C Espinós , T Sevilla

J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2016 Nov;87(11):1265-1268.

doi: 10.1136/jnnp-2015-312890. Epub 2016 Apr 15.

En este trabajo analizamos a fondo el fenotipo y la historia natural de los pacientes con neuropatía hereditaria debido a la mutación c.352 +1G>A en homocigosis en el gen *HSJ1* (también llamado *DNAJB2*). Para ello hemos estudiado 10 pacientes de 5 familias, 4 de ellas pertenecientes a la cohorte de pacientes del HUIP La Fe y la otra al Hospital Universitario Virgen del Rocío (Sevilla). Todos los pacientes presentaban el mismo cambio en homocigosis y habían sido diagnosticados mediante Sanger, panel de genes o exoma. Destacar que tres familias, aparentemente no emparentadas entre sí, procedían de la misma localidad de la Comunidad Valenciana.

Los pacientes tuvieron un largo tiempo de seguimiento, con una mediana de 20 años, y en algunos casos existían estudios electrofisiológicos seriados, lo que ha permitido analizar la historia natural de esta enfermedad. Gracias a ello, hemos podido observar que los pacientes podían ser diagnosticados de NHMd o CMT2 dependiendo del momento de evolución de la enfermedad. Los pacientes más jóvenes presentaban una afectación exclusivamente motora y distal de miembros inferiores, lo que se encuadraría dentro de un fenotipo clásico de NHMd. Sin embargo con el tiempo aparecía afectación sensitiva, tanto clínica como electrofisiológica. En cuanto a la debilidad, ésta siguió un curso progresivo extendiéndose primero a musculatura proximal de miembros inferiores y posteriormente afectando a los miembros superiores. En los pacientes que presentaban mayor tiempo de evolución apareció debilidad de la musculatura bulbar y facial, con necesidad de ventilación asistida y alimentación por gastrostomía percutánea. Se trata por tanto de una neuropatía progresiva y grave, cuyo estadio final es muy similar al de una ELA, con la diferencia de que en el caso de la neuropatía asociada a *HSJ1/DNAJB2* existe afectación sensitiva. Uno de los pacientes además desarrolló una demencia de perfil frontotemporal y otro de ellos un parkinsonismo de inicio a los 40 años y curso grave. Especulamos que la afectación a nivel del sistema nervioso central puede formar parte del espectro de la enfermedad ya que la proteína HSJ1 es una chaperona que evita la formación de agregados formados por la proteína SOD1 mutada asociada a ELA (Blumen *et al.*, 2012), y también por la proteína parkina mutada, asociada a su vez enfermedad de parkinson (Rose *et al.*, 2011). Nuestra hipótesis ha sido apoyada posteriormente por el hecho de que se han descrito otros pacientes con neuropatía por mutaciones bialélicas

en este gen que también presentaba parkinsonismo de inicio temprano (Sanchez *et al.*, 2016).



# **CONCLUSIONES**



## En castellano:

De la presente tesis doctoral se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Las NHMd son enfermedades poco frecuentes y existe una heterogeneidad importante en los genes causales en las diferentes series de pacientes.
2. En la mayoría de pacientes afectos de NHMd no se consigue un diagnóstico molecular a pesar de un estudio exhaustivo.
3. En el estudio actual la tasa de diagnóstico genético es del 47.8%.
4. La prevalencia mínima de NHMd en la Comunidad Valenciana es de 2.3 por 100,000 habitantes.
5. Las causas más frecuentes de NHMd en nuestra población son las mutaciones en *HSPB1*, *GARS1*, *BICD2* y *DNAJB2*.
6. Un 3.1% de pacientes con NHMd presenta mutaciones bialélicas en *SORD*.
7. En la Comunidad Valenciana existen “clusters” geográficos para determinadas mutaciones como c.418C>G en *HSPB1* y c.352+1G>A en *HSJ1/DNAJB2*.
8. La mayoría de pacientes afectos de NHMd son casos esporádicos y la edad de inicio de los síntomas más habitual es entre 2-10 años.
9. Los estudios de segregación son muy útiles para reclasificar las VUS identificadas en los pacientes.
10. Existe solapamiento clínico y genético entre las NHMd, el CMT2 y otras enfermedades neurogenerativas como las PEH y la ELA.
11. Describimos tres nuevas mutaciones patogénicas en *BICD2*.
12. Existe una variabilidad fenotípica importante en cuanto a la gravedad de la enfermedad en las neuropatías asociadas a *BICD2*.
13. La RM muscular juega un papel importante en el diagnóstico de las enfermedades neuromusculares asociadas a *BICD2*. En la RM muscular existe una afectación selectiva a nivel de músculos glúteo medio y mínimo, que se añade a los hallazgos típicos ya descritos previamente a nivel de muslos y piernas

14. Nuestros hallazgos plantean la posibilidad de que en los pacientes con mutaciones en *BICD2* exista afectación sensitiva además de motora que puede deberse a una afectación de fibra fina.
15. Las neuropatías por la mutación c.352+1G>A en *HSJ1/DNAJB2* en homocigosis dan lugar a una NHMd progresiva y grave que en estadios finales afecta a musculatura proximal y distal de extremidades y musculatura bulbar.
16. Los pacientes con neuropatías asociadas a la mutación c.352+1G>A en *HSJ1/DNAJB2* presentan inicialmente clínica exclusivamente motora y con el tiempo desarrollan clínica sensitiva.
17. Las mutaciones bialélicas en *HSJ1/DNAJB2* pueden dar lugar a parkinsonismo de inicio temprano asociado a la neuropatía.



## En inglés:

The following conclusions can be drawn from this doctoral thesis:

1. Distal hereditary motor neuropathies (dHMN) are rare diseases and the causative genes are quite heterogeneous in different series of patients.
2. Most patients with dHMN remain without a molecular diagnosis after a thorough genetic study.
3. In this study, the diagnosis rate is 47.8%.
4. The calculated minimum prevalence of dHMN in the Valencian Community is at least 2.3 per 100,000 individuals.
5. The most frequent genetic causes of dHMN in our population are mutations in *HSPB1*, *GARS1*, *BICD2* and *DNAJB2*.
6. In our dHMN population, 3.1% of patients carry biallelic mutations in *SORD*.
7. There is regional clustering of certain mutations such as c.418C> G in *HSPB1* and c.352 + 1G> in *HSJ1/DNAJB2*.
8. The majority of patients with dHMN are sporadic cases, and the most frequent age of clinical onset is between 2 and 10 years.
9. Segregation testing has been highly beneficial to reclassify the VUS identified in our cohort.
10. There is a certain clinical and genetic overlap between dHMN and CMT2, and other neurodegenerative diseases such as ALS and HSP.
11. We report three new pathogenic mutations in the *BICD2* gene.
12. There is significant clinical variability related to *BICD2* mutations.
13. Muscle MRI plays an important role in the diagnosis of neuromuscular diseases associated with *BICD2* mutations. MRI shows a common pattern of fat deposition including selective involvement of gluteus medius and minimus at the pelvic level, the anterior compartment of the thigh and the posterior compartment of the calf, with only mild or no involvement of the intrinsic foot muscles.
14. Our findings raise the possibility that patients with *BICD2* mutations could present sensory involvement due to small-fiber neuropathy.

15. The homozygous c.352 + 1G> A mutation in *HSJ1/DNAJB2* causes a progressive and severe dHMN. In the final stages of the disease, muscular weakness involves proximal and distal limb muscles as well as bulbar muscles.
16. Patients affected with inherited neuropathy caused by the homozygous *HSJ1* c.352 + 1G> A mutation initially present a pure motor phenotype with later-onset sensory involvement.
17. Biallelic mutations in *HSJ1/DNAJB2* can cause early-onset Parkinsonism associated with neuropathy.

# **BIBLIOGRAFÍA**



- Abbott JA, Meyer-Schuman R, Lupo V, Feely S, Mademan I, Oprescu SN, et al. Substrate interaction defects in histidyl-tRNA synthetase linked to dominant axonal peripheral neuropathy. *Hum Mutat* 2018; 39: 415–432.
- Abrams AJ, Hufnagel RB, Rebelo A, Zanna C, Patel N, Gonzalez MA, et al. Mutations in SLC25A46, encoding a UGO1-like protein, cause an optic atrophy spectrum disorder. *Nat Genet* 2015; 47: 926–932.
- Ackerley S, James PA, Kalli A, French S, Davies KE, Talbot K. A mutation in the small heat-shock protein HSPB1 leading to distal hereditary motor neuronopathy disrupts neurofilament assembly and the axonal transport of specific cellular cargoes. *Hum Mol Genet* 2006; 15: 347–54.
- Akçimen F, Vural A, Durmuş H, Çakar A, Houlden H, Parman YG, et al. A novel homozygous FBXO38 variant causes an early-onset distal hereditary motor neuropathy type IID. *J Hum Genet* 2019; 64: 1141–1144.
- Al-Saif A, Al-Mohanna F, Bohlega S. A mutation in sigma-1 receptor causes juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2011; 70: 913–919.
- Allgrove J, Clayden GS, Grant DB, Macaulay JC. Familial glucocorticoid deficiency with achalasia of the cardia and deficient tear production. *Lancet* 1978; 311: 1284–1286.
- Almendra L, Laranjeira F, Fernández-Marmiesse A, Negrão L. SIGMAR1 gene mutation causing Distal Hereditary Motor Neuropathy in a Portuguese family. *Acta Myol* 2018; 37: 2–4.
- Antonellis A, Ellsworth RE, Sambuughin N, Puls I, Abel A, Lee-Lin S-Q, et al. Glycyl tRNA Synthetase Mutations in Charcot-Marie-Tooth Disease Type 2D and Distal Spinal Muscular Atrophy Type V. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 1293–1299.
- Astrea G, Brisca G, Fiorillo C, Valle M, Tosetti M, Bruno C, et al. Muscle MRI in TRPV4-related congenital distal SMA. *Neurology* 2012; 78: 364–365.
- Auer-Grumbach M, Olschewski A, Papi L, Kremer H, McEntagart ME, Uhrig S, et al. Alterations in the ankyrin domain of TRPV4 cause congenital distal SMA, scapuloperoneal SMA and HMSN2C. *Nat Genet* 2010; 42: 160–164.
- Auer-Grumbach M, Weger M, Fink-Puches R, Papić L, Fröhlich E, Auer-Grumbach P, et al. Fibulin-5 mutations link inherited neuropathies, age-related macular degeneration and hyperelastic skin. *Brain* 2011; 134: 1839–1852.
- Bacquet J, Stojkovic T, Boyer A, Martini N, Audic F, Chabrol B, et al. Molecular diagnosis of inherited peripheral neuropathies by targeted next-generation sequencing: Molecular spectrum delineation. *BMJ Open* 2018; 8: e021632.
- Bannwarth S, Ait-El-Mkadem S, Chaussonot A, Genin EC, Lacas-Gervais S, Fragaki K, et al. A mitochondrial origin for frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis through CHCHD10 involvement. *Brain* 2014; 137: 2329–2345.
- Bansagi B, Antoniadis T, Burton-Jones S, Murphy SM, McHugh J, Alexander M, et al. Genotype/phenotype correlations in AARS-related neuropathy in a cohort of patients from the United Kingdom and Ireland. *J Neurol* 2015; 262: 1899–1908.
- Bansagi B, Griffin H, Ramesh V, Duff J, Pyle A, Chinnery PF, et al. The p.Ser107Leu in *BICD2* is a mutation ‘hot spot’ causing distal spinal muscular atrophy. *Brain* 2015; 138: e391–e391.

- Bansagi B, Griffin H, Whittaker RG, Antoniadis T, Evangelista T, Miller J, et al. Genetic heterogeneity of motor neuropathies. *Neurology* 2017; 88: 1226–1234.
- Barwick KES, Wright J, Al-Turki S, McEntagart MM, Nair A, Chioza B, et al. Defective presynaptic choline transport underlies hereditary motor neuropathy. *Am J Hum Genet* 2012; 91: 1103–1107.
- Bauché S, O'Regan S, Azuma Y, Laffargue F, McMacken G, Sternberg D, et al. Impaired Presynaptic High-Affinity Choline Transporter Causes a Congenital Myasthenic Syndrome with Episodic Apnea. *Am J Hum Genet* 2016; 99: 753–761.
- Beetz C, Pieber TR, Hertel N, Schabhüttl M, Fischer C, Trajanoski S, et al. Exome sequencing identifies a REEP1 mutation involved in distal hereditary motor neuropathy type v. *Am J Hum Genet* 2012; 91: 139–145.
- Beijer D, Baets J. The expanding genetic landscape of hereditary motor neuropathies. *Brain* 2020; 143: 3540–3563.
- Beijer D, Deconinck T, de Bleecker JL, Dotti MT, Malandrini A, Andoni Urtizberea J, et al. Nonsense mutations in alpha-II spectrin in three families with juvenile onset hereditary motor neuropathy. *Brain* 2019; 142: 2605–2616.
- Belzil V V, Daoud H, Camu W, Strong MJ, Dion PA, Rouleau GA. Genetic analysis of SIGMAR1 as a cause of familial ALS with dementia. *Eur J Hum Genet* 2013; 21: 237–239.
- Bertini E, Gadisseux JL, Palmieri G, Ricci E, Capua M Di, Ferriere G, et al. Distal infantile spinal muscular atrophy associated with paralysis of the diaphragm: A variant of infantile spinal muscular atrophy. *Am J Med Genet* 1989; 33: 328–335.
- Blackmore MG, Wang Z, Lerch JK, Motti D, Zhang YP, Shields CB, et al. Krüppel-like Factor 7 engineered for transcriptional activation promotes axon regeneration in the adult corticospinal tract. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 7517–7522.
- Blocquel D, Sun L, Matuszek Z, Li S, Weber T, Kuhle B, et al. CMT disease severity correlates with mutation-induced open conformation of histidyl-tRNA synthetase, not aminoacylation loss, in patient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019; 116: 19440–19448.
- Blumen SC, Astord S, Robin V, Vignaud L, Toumi N, Cieslik A, et al. A rare recessive distal hereditary motor neuropathy with HSP1 chaperone mutation. *Ann Neurol* 2012; 71: 509–519.
- Boczonadi V, King MS, Smith AC, Olahova M, Bansagi B, Roos A, et al. Mitochondrial oxodicarboxylate carrier deficiency is associated with mitochondrial DNA depletion and spinal muscular atrophy-like disease. *Genet Med* 2018; 20: 1224–1235.
- Boncoraglio A, Minoia M, Carra S. The family of mammalian small heat shock proteins (HSPBs): Implications in protein deposit diseases and motor neuropathies. *Int J Biochem Cell Biol* 2012; 44: 1657–69.
- Boylan KB, Cornblath ; D R, Glass ; J D, Alderson ; K, Kuncl ; R W, Kleyn ; P W, et al. Autosomal dominant distal spinal muscular atrophy in four generations. *Neurology* 1995; 45: 699–704.
- Bugiardini E, Rossor AM, Lynch DS, Swash M, Pittman AM, Blake JC, et al. Homozygous mutation in *HSPB1* causing distal vacuolar myopathy and motor neuropathy. *Neurol Genet* 2017; 3: e168.

- Butterfield RJ, Stevenson TJ, Xing L, Newcomb TM, Nelson B, Zeng W, et al. Congenital lethal motor neuron disease with a novel defect in ribosome biogenesis. *Neurology* 2014; 82: 1322–1330.
- Capponi S, Geroldi A, Fossa P, Grandis M, Ciotti P, Gulli R, et al. HSPB1 and HSPB8 in inherited neuropathies: study of an Italian cohort of dHMN and CMT2 patients. *J Peripher Nerv Syst* 2011; 16: 287–294.
- Carra S, Sivilotti M, Zobel ATC, Lambert H, Landry J. HspB8, a small heat shock protein mutated in human neuromuscular disorders, has in vivo chaperone activity in cultured cells. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 1659–69.
- Chen Y-Z, Bennett CL, Huynh HM, Blair IP, Puls I, Irobi J, et al. DNA/RNA Helicase Gene Mutations in a Form of Juvenile Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS4). *Am J Hum Genet* 2004; 74: 1128–1135.
- Choi BO, Hee Kang S, Hyun YS, Kanwal S, Park SW, Koo H, et al. A complex phenotype of peripheral neuropathy, myopathy, hoarseness, and hearing loss is linked to an autosomal dominant mutation in MYH14. *Hum Mutat* 2011; 32: 669–677.
- Choi BO, Koo SK, Park MH, Rhee H, Yang SJ, Choi KG, et al. Exome sequencing is an efficient tool for genetic screening of Charcot-Marie-Tooth Disease. *Hum Mutat* 2012; 33: 1610–1615.
- Chow CY, Zhang Y, Dowling JJ, Jin N, Adamska M, Shiga K, et al. Mutation of FIG4 causes neurodegeneration in the pale tremor mouse and patients with CMT4J. *Nature* 2007; 448: 68–72.
- Christodoulou K, Kyriakides T, Hristova AH, Georgiou D-M, Kalaydjieva L, Yshpekova B, et al. Mapping of a distal form of spinal muscular atrophy with upper limb predominance to chromosome 7p. 1995
- Chung KW, Kim S-B, Cho SY, Hwang SJ, Park SW, Kang SH, et al. Distal hereditary motor neuropathy in Korean patients with a small heat shock protein 27 mutation. *Exp Mol Med* 2008; 40: 304–12.
- Claeys KG, Züchner S, Kennerson M, Berciano J, Garcia A, Verhoeven K, et al. Phenotypic spectrum of dynamin 2 mutations in Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Brain* 2009; 132: 1741–1752.
- Cohen S, Puget N, Lin YL, Clouaire T, Aguirrebengoa M, Rocher V, et al. Senataxin resolves RNA:DNA hybrids forming at DNA double-strand breaks to prevent translocations. *Nat Commun* 2018; 9
- Combarros O, Calleja J, Polo JM, Berciano J. Prevalence of hereditary motor and sensory neuropathy in Cantabria. *Acta Neurol Scand* 1987; 75: 9–12.
- Cortese A, Simone R, Sullivan R, Vandrovцова J, Tariq H, Yau WY, et al. Biallelic expansion of an intronic repeat in RFC1 is a common cause of late-onset ataxia. *Nat Genet* 2019; 51: 649–658.
- Cortese A, Wilcox JE, Polke JM, Poh R, Skorupinska M, Rossor AM, et al. Targeted next-generation sequencing panels in the diagnosis of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurology* 2020; 94: e51–e61.
- Cortese A, Zhu Y, Rebelo AP, Negri S, Courel S, Abreu L, et al. Biallelic mutations in SORD cause a common and potentially treatable hereditary neuropathy with implications for diabetes. *Nat*

Genet 2020; 52: 473–481.

Cottenie E, Kochanski A, Jordanova A, Bansagi B, Zimon M, Horga A, et al. Truncating and missense mutations in IGHMBP2 cause Charcot-Marie Tooth disease type 2. *Am J Hum Genet* 2014; 95: 590–601.

Couthouis J, Hart MP, Shorter J, DeJesus-Hernandez M, Erion R, Oristano R, et al. A yeast functional screen predicts new candidate ALS disease genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 20881–20890.

Cui X, Wang Y, Tang Y, Liu Y, Zhao L, Deng J, et al. Seipin ablation in mice results in severe generalized lipodystrophy. *Hum Mol Genet* 2011; 20: 3022–3030.

DeLong R, Siddique T. A Large New England Kindred with Autosomal Dominant Neurogenic Scapuloperoneal Amyotrophy with Unique Features. *Arch Neurol* 1992; 49: 905–908.

Deng HX, Klein CJ, Yan J, Shi Y, Wu Y, Fecto F, et al. Scapuloperoneal spinal muscular atrophy and CMT2C are allelic disorders caused by alterations in TRPV4. *Nat Genet* 2010; 42: 165–169.

Dierick I, Baets J, Irobi J, Jacobs A, De Vriendt E, Deconinck T, et al. Relative contribution of mutations in genes for autosomal dominant distal hereditary motor neuropathies: A genotype-phenotype correlation study. *Brain* 2008; 131: 1217–1227.

Donaudy F, Snoeckx R, Pfister M, Zenner H-P, Blin N, Stazio M Di, et al. Nonmuscle Myosin Heavy-Chain Gene MYH14 Is Expressed in Cochlea and Mutated in Patients Affected by Autosomal Dominant Hearing Impairment (DFNA4). 2004

Drew AP, Blair IP, Nicholson GA. Molecular Genetics and Mechanisms of Disease in Distal Hereditary Motor Neuropathies: Insights Directing Future Genetic Studies. *Curr Mol Med* 2011; 11: 650–665.

Dyck PJ, Lambert EH. Lower Motor and Primary Sensory Neuron Diseases With Peroneal Muscular Atrophy I. Neurologic, Genetic, and Electrophysiologic Findings in Hereditary Polyneuropathies. *Arch Neurol* 1968; 18: 603–618.

Dyck PJ, Litchy WJ, Minnerath S, Bird TD, Chance PF, Schaid DJ, et al. Hereditary motor and sensory neuropathy with diaphragm and vocal cord paresis. *Ann Neurol* 1994; 35: 608–615.

Echaniz-Laguna A, Geuens T, Petiot P, Péréon Y, Adriaenssens E, Haidar M, et al. Axonal Neuropathies due to Mutations in Small Heat Shock Proteins: Clinical, Genetic and Functional Insights into Novel Mutations. *Hum Mutat* 2017; 38: 556–568.

Evangelista T, Bansagi B, Pyle A, Griffin H, Douroudis K, Polvikoski T, et al. Phenotypic variability of TRPV4 related neuropathies. *Neuromuscul Disord* 2015; 25: 516–521.

Farrer MJ, Hulihan MM, Kachergus JM, Dächsel JC, Stoessl AJ, Grantier LL, et al. DCTN1 mutations in Perry syndrome. *Nat Genet* 2009; 41: 163–165.

Feng SY, Li LY, Feng SM, Zou ZY. A novel VRK1 mutation associated with recessive distal hereditary motor neuropathy. *Ann Clin Transl Neurol* 2019; 6: 401–405.

Fiorillo C, Moro F, Yi J, Weil S, Brisca G, Astrea G, et al. Novel dynein DYNC1H1 neck and motor domain mutations link distal spinal muscular atrophy and abnormal cortical development. *Hum Mutat* 2014; 35: 298–302.

Fischer D, Kley RA, Strach K, Meyer C, Sommer T, Eger K, et al. Distinct muscle imaging patterns



in myofibrillar myopathies. *Neurology* 2008; 71: 758–765.

Fleury P, Hagemant G. A dominantly inherited lower motor neuron disorder presenting at birth with associated arthrogyriposis. 1985

Foley C, Schofield I, Eglon G, Bailey G, Chinnery PF, Horvath R. Charcot-Marie-Tooth disease in Northern England. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2012; 83: 572–3.

Frasquet M, Camacho A, Vélchez R, Argente-Escrig H, Millet E, Vázquez-Costa JF, et al. Clinical spectrum of BICD2 mutations. *Eur J Neurol* 2020; 27: 1327-1335.

Frasquet M, Chumillas MJ, Vélchez JJ, Márquez-Infante C, Palau F, Vázquez-Costa JF, et al. Phenotype and natural history of inherited neuropathies caused by HSJ1 c.352+1G>A mutation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2016; 87: 1265–1268.

Fridman V, Bundy B, Reilly MM, Pareyson D, Bacon C, Burns J, et al. CMT subtypes and disease burden in patients enrolled in the Inherited Neuropathies Consortium natural history study: A cross-sectional analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2015; 86: 873–878.

Gallardo E, García A, Combarros O, Berciano J. Charcot-Marie-Tooth disease type 1A duplication: Spectrum of clinical and magnetic resonance imaging features in leg and foot muscles. *Brain* 2006; 129: 426–437.

Gartner V, Markello TC, Macnamara E, De Biase A, Thurm A, Joseph L, et al. Novel variants in SPTAN1 without epilepsy: An expansion of the phenotype. *Am J Med Genet Part A* 2018; 176: 2768–2776.

Van Gent EM, Hoogland RA, Jennekens FGI. Distal amyotrophy of predominantly the upper limbs with pyramidal features in a large kinship. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1985; 48: 266–269.

Ghaoui R, Palmio J, Brewer J, Lek M, Needham M, Evilä A, et al. Mutations in HSPB8 causing a new phenotype of distal myopathy and motor neuropathy. *Neurology* 2016; 86: 391–398.

Ghezzi D, Sevrioukova I, Invernizzi F, Lamperti C, Mora M, D'Adamo P, et al. Severe X-linked mitochondrial encephalomyopathy associated with a mutation in apoptosis-inducing factor. *Am J Hum Genet* 2010; 86: 639–649.

Gonzaga-Jauregui C, Lotze T, Jamal L, Penney S, Campbell IM, Pehlivan D, et al. Mutations in VRK1 associated with complex motor and sensory axonal neuropathy plus microcephaly. *JAMA Neurol* 2013; 70: 1491–1498.

Green P, Wiseman M, Crow YJ, Houlden H, Riphagen S, Lin JP, et al. Brown-Vialetto-Van Laere Syndrome, a Ponto-Bulbar Palsy with Deafness, Is Caused by Mutations in C20orf54. *Am J Hum Genet* 2010; 86: 485–489.

Greenbaum L, Barel O, Nikitin V, Hersalis-Eldar A, Kol N, Reznik-Wolf H, et al. Identification of a homozygous VRK1 mutation in two patients with adult-onset distal hereditary motor neuropathy. *Muscle and Nerve* 2020; 61: 395–400.

Griffin LB, Sakaguchi R, Mcguigan D, Gonzalez MA, Searby C, Z??chner S, et al. Impaired function is a common feature of neuropathy-associated glycyl-tRNA synthetase mutations. *Hum Mutat* 2014; 35: 1363–1371.

Grigoriev I, Splinter D, Keijzer N, Wulf PS, Demmers J, Ohtsuka T, et al. Rab6 Regulates

Transport and Targeting of Exocytotic Carriers. *Dev Cell* 2007; 13: 305–314.

Grohmann K, Schuelke M, Diers A, Hoffmann K, Lucke B, Adams C, et al. Mutations in the gene encoding immunoglobulin  $\mu$ -binding protein 2 cause spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1. *Nat Genet* 2001; 29: 75–77.

Grohmann K, Schuelke M, Diers A, Hoffmann K, Lucke B, Adams C, et al. Mutations in the gene encoding immunoglobulin  $\mu$ -binding protein 2 cause spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1. *Nat Genet* 2001; 29: 75–77.

Grohmann K, Varon R, Stolz P, Schuelke M, Janetzki C, Bertini E, et al. Infantile spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1 (SMARD1). *Ann Neurol* 2003; 54: 719–724.

Grohmann K, Wienker T, Saar K, Rudnik-Schöneborn S, Stoltenburg-Didinger G, Rossi R, et al. Diaphragmatic spinal muscular atrophy with respiratory distress is heterogeneous, and one form is linked to chromosome 11q13-q21. *Am J Hum Genet* 1999; 65: 1459–1462.

Gross DW, Rajput AH, Yeung M. Distal hereditary upper limb muscular atrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998; 64: 217–220.

Gualandi F, Sette E, Fortunato F, Bigoni S, De Grandis D, Scotton C, et al. Report of a novel ATP7A mutation causing distal motor neuropathy. *Neuromuscul Disord* 2019; 29: 776–785.

Guenther UP, Handoko L, Lagerbauer B, Jablonka S, Chari A, Alzheimer M, et al. IGHMBP2 is a ribosome-associated helicase inactive in the neuromuscular disorder distal SMA type 1 (DSMA1). *Hum Mol Genet* 2009; 18: 1288–1300.

Gutierrez-Rivas E, Jiménez MD, Pardo J, Romero-Acebal M. MANUAL DE ELECTRIOMIOGRAFÍA CLÍNICA. 3ª. ERGON; 2021

Hamanaka K, Takahashi K, Miyatake S, Mitsunashi S, Hamanoue H, Miyaji Y, et al. Confirmation of SLC5A7-related distal hereditary motor neuropathy 7 in a family outside Wales. *Clin Genet* 2018; 94: 274–275.

Hangen E, Blomgren K, Bénit P, Kroemer G, Modjtahedi N. Life with or without AIF. *Trends Biochem Sci* 2010; 35: 278–287.

Harding AE. Inherited neuronal atrophy and degeneration predominantly of lower motor neurons. In: Dyck PJ, Thomas PK, Griffin JW LP, Podulso JF, editor(s). *Peripheral neuropathy*. Philadelphia: WB Saunders; 1993. p. 1051–1064

Harding AE. Inherited Neuronal Atrophy and Degeneration Predominantly of Lower Motor Neurons. In: Dyck PJ, Thomas PK, editor(s). *Peripheral Neuropathy*. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005. p. 1603–1621

Harding AE, Thomas PK. HEREDITARY DISTAL SPINAL MUSCULAR ATROPHY A Report on 34 Cases and a Review of the Literature. *J Neurol Sci* 1980; 45: 337–348.

Harms MB, Ori-McKenney KM, Scoto M, Tuck EP, Bell S, Ma D, et al. Mutations in the tail domain of DYNC1H1 cause dominant spinal muscular atrophy. *Neurology* 2012; 78: 1714–20.

Hartley T, Wagner JD, Warman-Chardon J, Tétreault M, Brady L, Baker S, et al. Whole-exome sequencing is a valuable diagnostic tool for inherited peripheral neuropathies: Outcomes from a cohort of 50 families. *Clin Genet* 2018; 93: 301–309.

Hebert MD, Szymczyk PW, Shpargel KB, Gregory Matera A. Coilin forms the bridge between

- Cajal bodies and SMN, the spinal muscular atrophy protein. *Genes Dev* 2001; 15: 2720–2729.
- Herrmann DN, Horvath R, Sowden JE, Gonzales M, Sanchez-Mejias A, Guan Z, et al. Synaptotagmin 2 mutations cause an autosomal-dominant form of Lambert-Eaton myasthenic syndrome and nonprogressive motor neuropathy. *Am J Hum Genet* 2014; 95: 332–339.
- Higuchi Y, Hashiguchi A, Yuan J, Yoshimura A, Mitsui J, Ishiura H, et al. Mutations in MME cause an autosomal-recessive Charcot–Marie–Tooth disease type 2. *Ann Neurol* 2016; 79: 659–672.
- Holzbaur ELF, Tokito MK. BRIEF REPORT. 1996
- Hong D, Fang P, Yao S, Chen J, Zhang X, Chen S, et al. Variants in MME are associated with autosomal-recessive distal hereditary motor neuropathy. *Ann Clin Transl Neurol* 2019; 6: 1728–1738.
- Hoogenraad CC, Wulf P, Schiefermeier N, Stepanova T, Galjart N, Small JV, et al. Bicaudal D induces selective dynein-mediated microtubule minus end-directed transport. *EMBO J* 2003; 22: 6004–6015.
- Horga A, Tomaselli PJ, Gonzalez MA, Laurà M, Muntoni F, Manzur AY, et al. SIGMAR1 mutation associated with autosomal recessive Silver-like syndrome. *Neurology* 2016; 87: 1607–1612.
- Houlden H, Laura M, Wavrant-De Vrièze F, Blake J, Wood N, Reilly MM. Mutations in the HSP27 (HSPB1) gene cause dominant, recessive, and sporadic distal HMN/CMT type 2. *Neurology* 2008; 71: 1660–1668.
- Houlden H, Smith S, Carvalho M De, Blake J, Mathias C, Wood NW, et al. Clinical and genetic characterization of families with triple A (Allgrove) syndrome. *Brain* 2002; 125: 2681–2690.
- Huang CYM, Zhang C, Zollinger DR, Letierrier C, Rasband MN. An  $\alpha$ II spectrin-based cytoskeleton protects large-diameter myelinated axons from degeneration. *J Neurosci* 2017; 37: 11323–11334.
- Ingram G, Barwick KES, Hartley L, McEntagart M, Crosby AH, Llewelyn G, et al. Distal hereditary motor neuropathy with vocal cord paresis: From difficulty in choral singing to a molecular genetic diagnosis. *Pract Neurol* 2016; 16: 247–251.
- Irobi J, Van Den Bergh P, Merlini L, Verellen C, Van Maldergem L, Dierick I, et al. The phenotype of motor neuropathies associated with BSCL2 mutations is broader than Silver syndrome and distal HMN type V. *Brain* 2004; 127: 2124–2130.
- Irobi J, Van Impe K, Seeman P, Jordanova A, Dierick I, Verpoorten N, et al. Hot-spot residue in small heat-shock protein 22 causes distal motor neuropathy. *Nat Genet* 2004; 36: 597–601.
- Irobi J, Van Impe K, Seeman P, Jordanova A, Dierick I, Verpoorten N, et al. Hot-spot residue in small heat-shock protein 22 causes distal motor neuropathy. *Nat Genet* 2004; 36: 597–601.
- Iyadurai S, Arnold WD, Kissel JT, Ruhno C, McGovern VL, Snyder PJ, et al. Variable phenotypic expression and onset in MYH14 distal hereditary motor neuropathy phenotype in a large, multigenerational North American family. *Muscle and Nerve* 2017; 56: 341–345.
- Jokela M, Penttilä S, Huovinen MS, Hackman P, Saukkonen AM, Toivanen J, et al. Late-onset lower motor neuronopathy: A new autosomal dominant disorder. *Neurology* 2011; 77: 334–340.
- De Jonghe P, Auer-Grumbach M, Irobi J, Wagner K, Plecko B, Kennerson M, et al. Autosomal

dominant juvenile amyotrophic lateral sclerosis and distal hereditary motor neuropathy with pyramidal tract signs: synonyms for the same disorder? *Brain* 2002; 125: 1320–5.

Kahle KT, Flores B, Bharucha-Goebel D, Zhang J, Donkervoort S, Hegde M, et al. Peripheral motor neuropathy is associated with defective kinase regulation of the KCC3 cotransporter. *Sci Signal* 2016; 9

Kennerson M, Nicholson G, Kowalski B, Krajewski K, El-Khechen D, Feely S, et al. X-linked distal hereditary motor neuropathy maps to the DSMAX locus on chromosome Xq13.1-q21. 2009

Kennerson ML, Nicholson GA, Kaler SG, Kowalski B, Mercer JFB, Tang J, et al. Missense Mutations in the Copper Transporter Gene ATP7A Cause X-Linked Distal Hereditary Motor Neuropathy. *Am J Hum Genet* 2010; 86: 343–352.

Kim HJ, Hong Y Bin, Park JM, Choi YR, Kim YJ, Yoon BR, et al. Mutations in the PLEKHG5 gene is relevant with autosomal recessive intermediate Charcot-Marie-Tooth disease. *Orphanet J Rare Dis* 2013; 8: 1.

Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 1998; 392: 605–608.

Kolb SJ, Snyder PJ, Poi EJ, Renard EA, Bartlett A, Gu S, et al. Mutant small heat shock protein B3 causes motor neuropathy: Utility of a candidate gene approach. *Neurology* 2010; 74: 502–506.

Landouré G, Zdebek AA, Martinez TL, Burnett BG, Stanescu HC, Inada H, et al. Mutations in TRPV4 cause Charcot-Marie-Tooth disease type 2C. *Nat Genet* 2010; 42: 170–174.

Laššuthová P, Šafka Brožková D, Krůtová M, Neupauerová J, Haberlová J, Mazanec R, et al. Improving diagnosis of inherited peripheral neuropathies through gene panel analysis. *Orphanet J Rare Dis* 2016; 11: 118.

Latour P, Thauvin-Robinet C, Baudalet-Méry C, Soichot P, Cusin V, Faivre L, et al. A Major Determinant for Binding and Aminoacylation of tRNA<sup>Ala</sup> in Cytoplasmic Alanyl-tRNA Synthetase Is Mutated in Dominant Axonal Charcot-Marie-Tooth Disease. *Am J Hum Genet* 2010; 86: 77–82.

Laurá M, Pipis M, Rossor AM, Reilly MM. Charcot-Marie-Tooth disease and related disorders: an evolving landscape. *Curr Opin Neurol* 2019; 32: 641–650.

Lee HJ, Park J, Nakhro K, Mo Park J, Hur Y-M, Choi B-O, et al. Two novel mutations of GARS in Korean families with distal hereditary motor neuropathy type V. *J Peripher Nerv Syst* 2012; 17: 418–421.

Leveille E, Estiar MA, Krohn L, Spiegelman D, Dionne-Laporte A, Dupré N, et al. SPTAN1 variants as a potential cause for autosomal recessive hereditary spastic paraplegia. *J Hum Genet* 2019; 64: 1145–1151.

Lewis-Smith DJ, Duff J, Pyle A, Griffin H, Polvikoski T, Birchall D, et al. Novel HSPB1 mutation causes both motor neuronopathy and distal myopathy. *Neurol Genet* 2016; 2: e110.

Li JQ, Dong HL, Chen CX, Wu ZY. A novel WARS mutation causes distal hereditary motor neuropathy in a Chinese family. *Brain* 2019; 142: 1–4.

Li N, Wang L, Sun X, Lu Z, Suo X, Li J, et al. A novel mutation in VRK1 associated with distal spinal muscular atrophy. *J Hum Genet* 2019; 64: 215–219.

- Li X, Hu Z, Liu L, Xie Y, Zhan Y, Zi X, et al. A SIGMAR1 splice-site mutation causes distal hereditary motor neuropathy. *Neurology* 2015; 84: 2430–2437.
- Lim Y, Cho I-T, Schoel LJ, Cho G, Golden JA. Hereditary spastic paraplegia-linked REEP1 modulates endoplasmic reticulum/mitochondria contacts. *Ann Neurol* 2015; 78: 679–696.
- Liu X, Duan X, Zhang Y, Sun A, Fan D. Molecular analysis and clinical diversity of distal hereditary motor neuropathy. *Eur J Neurol* 2020; 27: 1319-1326.
- Lorenzo IM, Liedtke W, Sanderson MJ, Valverde MA. TRPV4 channel participates in receptor-operated calcium entry and ciliary beat frequency regulation in mouse airway epithelial cells. 2008
- Lüningschrör P, Binotti B, Dombert B, Heimann P, Perez-Lara A, Slotta C, et al. Plekhg5-regulated autophagy of synaptic vesicles reveals a pathogenic mechanism in motoneuron disease. *Nat Commun* 2017; 8: 1–16.
- Lupo V, Frasquet M, Sánchez-Monteagudo A, Pelayo-Negro AL, García-Sobrino T, Sedano MJ, et al. Characterising the phenotype and mode of inheritance of patients with inherited peripheral neuropathies carrying MME mutations. *J Med Genet* 2018
- Lupo V, García-García F, Sancho P, Tello C, García-Romero M, Villarreal L, et al. Assessment of Targeted Next-Generation Sequencing as a Tool for the Diagnosis of Charcot-Marie-Tooth Disease and Hereditary Motor Neuropathy. *J Mol Diagnostics* 2016; 18: 225–234.
- Luty AA, Kwok JBJ, Dobson-Stone C, Loy CT, Coupland KG, Karlström H, et al. Sigma nonopioid intracellular receptor 1 mutations cause frontotemporal lobar degeneration-motor neuron disease. *Ann Neurol* 2010; 68: 639–649.
- Magré J, Delépine M, Khallouf E, Gedde-Dahl T, Van Maldergem L, Sobel E, et al. Identification of the gene altered in Berardinelli–Seip congenital lipodystrophy on chromosome 11q13. *Nat Genet* 2001; 28: 365–370.
- Marcos AT, Martín-Doncel E, Morejón-García P, Marcos-Alcalde I, Gómez-Puertas P, Segura-Puimedon M, et al. VRK1 (Y213H) homozygous mutant impairs Cajal bodies in a hereditary case of distal motor neuropathy. *Ann Clin Transl Neurol* 2020; 7: 808–818.
- Martin J-J, Brice A, Van Broeckhoven C. 4th Workshop of the European CMT-Consortium – 62nd ENMC International Workshop: Rare forms of Charcot-Marie-Tooth disease and related disorders. 16–18 October 1998, Soestduinen, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* 1999; 9: 279–287.
- Maystadt I, Rezsöhazy R, Barkats M, Duque S, Vannuffel P, Remacle S, et al. The nuclear factor  $\kappa$ B-activator gene PLEKHG5 is mutated in a form of autosomal recessive lower motor neuron disease with childhood onset. *Am J Hum Genet* 2007; 81: 67–76.
- Maystadt I, Zarhrate M, Leclair-Richard D, Estournet B, Barois A, Renault F, et al. A gene for an autosomal recessive lower motor neuron disease with childhood onset maps to 1p36. *Neurology* 2006; 67: 120–124.
- McEntagart M. TRPV4 axonal neuropathy spectrum disorder. *J Clin Neurosci* 2012; 19: 927–933.
- McEntagart M, Norton N, Williams H, Dawn Teare M, Dunstan M, Baker P, et al. Localization of the Gene for Distal Hereditary Motor Neuronopathy VII (dHMN-VII) to Chromosome 2q14.

2001

McEntagart ME, Reid SL, Irthum A, Douglas JB, Eyre KED, Donaghy MJ, et al. Confirmation of a hereditary motor and sensory neuropathy IIC locus at chromosome 12q23-q24. *Ann Neurol* 2005; 57: 293–297.

Mercuri E, Pichiecchio A, Allsop J, Messina S, Pane M, Muntoni F. Muscle MRI in inherited neuromuscular disorders: Past, present, and future. *J Magn Reson Imaging* 2007

Meyertholen K, Ravnán JB, Matalon R. Identification of a Novel 14q13.3 Deletion Involving the SLC25A21 Gene Associated with Familial Synpolydactyly. *Mol Syndromol* 2012; 3: 25–29.

Middleton LT, Christodoulou K, Mubaidin A, Zamba E, Tsingis M, Kyriacou K, et al. Distal hereditary motor neuronopathy of the Jerash type. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 883: 439–442.

Miura S, Kosaka K, Nomura T, Nagata S, Shimojo T, Morikawa T, et al. TDRKH is a candidate gene for an autosomal dominant distal hereditary motor neuropathy. *Eur J Med Genet* 2019; 62

Montecchiani C, Pedace L, Lo Giudice T, Casella A, Mearini M, Gaudiello F, et al. ALS5/SPG11/KIAA1840 mutations cause autosomal recessive axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Brain* 2016; 139: 73–85.

Montes-Chinea NI, Guan Z, Coutts M, Vidal C, Courel S, Rebelo AP, et al. Identification of a new SYT2 variant validates an unusual distal motor neuropathy phenotype. *Neurol Genet* 2018; 4: 1–9.

Moreira MC, Klur S, Watanabe M, Németh AH, Le Ber I, Moniz JC, et al. Senataxin, the ortholog of a yeast RNA helicase, is mutant in ataxia-ocular apraxia 2. *Nat Genet* 2004; 36: 225–227.

Mukhopadhyaya A, Danda S, Huebner A, Chacko A. Mutations of the AAAS gene in an Indian family with Allgrove's syndrome. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4764–4766.

Müller KI, Ghelue M Van, Lund I, Jonsrud C, Arntzen KA. The prevalence of hereditary neuromuscular disorders in Northern Norway. *Brain Behav* 2021; 11: e01948.

Murphy SM, Herrmann DN, McDermott MP, Scherer SS, Shy ME, Reilly MM, et al. Reliability of the CMT neuropathy score (second version) in Charcot-Marie-Tooth disease. *J Peripher Nerv Syst* 2011; 16: 191–198.

Murphy SM, Laura M, Fawcett K, Pandraud A, Liu Y-T, Davidson GL, et al. Charcot-Marie-Tooth disease: frequency of genetic subtypes and guidelines for genetic testing. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2012; 83: 706–710.

Nam DE, Nam SH, Lee AJ, Hong Y Bin, Choi B-OO, Chung KW. Small Heat Shock Protein B3 (HSPB3) Mutation in an Axonal Charcot-Marie-Tooth Disease Family. *J Peripher Nerv Syst* 2018; 23: 60–66.

Nam SH, Hong Y Bin, Hyun YS, Kwak G, Hwang SH, Choi B, et al. Identification of Genetic Causes of Inherited Peripheral Neuropathies by Targeted Gene Panel Sequencing. *Mol Cells* 2016; 39: 1–7.

Nandhagopal R, Meftah D, Al-Kalbani S, Scott P. Recessive distal motor neuropathy with pyramidal signs in an Omani kindred: underlying novel mutation in the SIGMAR1 gene. *Eur J Neurol* 2018; 25: 395–403.

- Neveling K, Martinez-Carrera LA, Hölker I, Heister A, Verrips A, Hosseini-Barkooie SM, et al. Mutations in BICD2, which encodes a golgin and important motor adaptor, cause congenital autosomal-dominant spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet* 2013; 92: 946–954.
- Nguyen TP, Biliciler S, Wiszniewski W, Sheikh K. Expanding Phenotype of VRK1 Mutations in Motor Neuron Disease. *J Clin Neuromuscul Dis* 2015; 17: 69–71.
- Nousiainen HO, Kestilä M, Pakkasjärvi N, Honkala H, Kuure S, Tallila J, et al. Mutations in mRNA export mediator GLE1 result in a fetal motoneuron disease. *Nat Genet* 2008; 40: 155–157.
- O’Hanlon TP, Miller FW. Genomic organization, transcriptional mapping, and evolutionary implications of the human bi-directional histidyl-tRNA synthetase locus (HARS/HARSL). *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 294: 609–614.
- Oates EC, Reddel S, Rodriguez ML, Gandolfo LC, Bahlo M, Hawke SH, et al. Autosomal dominant congenital spinal muscular atrophy: A true form of spinal muscular atrophy caused by early loss of anterior horn cells. *Brain* 2012; 135: 1714–1723.
- Oates EC, Rossor AM, Hafezparast M, Gonzalez M, Speziani F, Macarthur DG, et al. Mutations in BICD2 cause dominant congenital spinal muscular atrophy and hereditary spastic paraplegia. *Am J Hum Genet* 2013; 92: 965–973.
- Orlacchio A, Babalini C, Borreca A, Patrono C, Massa R, Basaran S, et al. SPATACSIN mutations cause autosomal recessive juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 2010; 133: 591–598.
- Pagnamenta AT, Kaiyrzhanov R, Zou Y, Da’as SI, Maroofian R, Donkervoort S, et al. An ancestral 10-bp repeat expansion in *VWA1* causes recessive hereditary motor neuropathy. *Brain* 2021
- Park SH, Zhu PP, Parker RL, Blackstone C. Hereditary spastic paraplegia proteins REEP1, spastin, and atlastin-1 coordinate microtubule interactions with the tubular ER network. *J Clin Invest* 2010; 120: 1097–1110.
- Peeters K, Chamova T, Tournev I, Jordanova A. Axonal neuropathy with neuromyotonia: there is a HINT. *Brain* 2017; 140: 868–877.
- Peeters K, Litvinenko I, Asselbergh B, Almeida-Souza L, Chamova T, Geuens T, et al. Molecular defects in the motor adaptor BICD2 cause proximal spinal muscular atrophy with autosomal-dominant inheritance. *Am J Hum Genet* 2013; 92: 955–964.
- Penttilä S, Jokela M, Bouquin H, Saukkonen AM, Toivanen J, Udd B. Late onset spinal motor neuropathy is caused by mutation in CHCHD10. *Ann Neurol* 2015; 77: 163–172.
- Penttilä S, Jokela M, Hackman P, Maija Saukkonen A, Toivanen J, Udd B. Autosomal dominant late-onset spinal motor neuropathy is linked to a new locus on chromosome 22q11.2-q13.2. *Eur J Hum Genet* 2012; 20: 1193–1196.
- Perry TL, Bratty PJA, Hansen S, Kennedy J, Urquhart N, Dolman CL. Hereditary Mental Depression and Parkinsonism With Taurine Deficiency. *Arch Neurol* 1975; 32: 108–113.
- Pestronk A. NEUROMUSCULAR DISEASE CENTER , Washington University, St. Louis, MO USA [Internet]. Available from: <https://neuromuscular.wustl.edu/index.html>
- Pipis M, Rossor AM, Laura M, Reilly MM. Next-generation sequencing in Charcot–Marie–Tooth disease: opportunities and challenges. *Nat Rev Neurol* 2019; 15: 644–656.
- Poirier K, Lebrun N, Broix L, Tian G, Saillour Y, Boscheron C, et al. Mutations in TUBG1,

DYNC1H1, KIF5C and KIF2A cause malformations of cortical development and microcephaly. *Nat Genet* 2013; 45: 639–647.

Previtali SC, Zhao E, Lazarevic D, Pipitone GB, Fabrizi GM, Manganelli F, et al. Expanding the spectrum of genes responsible for hereditary motor neuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2019; 90: 1171–1179.

Pridmore C, Baraitser M, Brett EM, Harding AE, Pridmore 1eh C. Distal spinal muscular atrophy with vocal cord paralysis A E Harding Correspondence to. 1992

Puls I, Jonnakuty C, LaMonte BH, Holzbaur ELF, Tokito M, Mann E, et al. Mutant dynactin in motor neuron disease. *Nat Genet* 2003; 33: 455–456.

Rabin BA, Griffin JW, Crain BJ, Scavina M, Chance PF, Cornblath DR. Autosomal dominant juvenile amyotrophic lateral sclerosis. 1999

Ramser J, Ahearn ME, Lenski C, Yariz KO, Hellebrand H, von Rhein M, et al. Rare Missense and Synonymous Variants in UBE1 Are Associated with X-Linked Infantile Spinal Muscular Atrophy. *Am J Hum Genet* 2008; 82: 188–193.

Ravenscroft G, Di Donato N, Hahn G, Davis MR, Craven PD, Poke G, et al. Recurrent de novo BICD2 mutation associated with arthrogryposis multiplex congenita and bilateral perisylvian polymicrogyria. *Neuromuscul Disord* 2016; 26: 744–748.

Reck-Peterson SL, Redwine WB, Vale RD, Carter AP. The cytoplasmic dynein transport machinery and its many cargoes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018; 19: 382–398.

Reid E. Many pathways lead to hereditary spastic paraplegia. *Lancet Neurol* 2003; 2: 210.

Reilly MM, Murphy SM, Laurá M. Charcot-Marie-Tooth disease. *J Peripher Nerv Syst* 2011; 16: 1–14.

Renbaum P, Kellerman E, Jaron R, Geiger D, Segel R, Lee M, et al. Spinal Muscular Atrophy with Pontocerebellar Hypoplasia Is Caused by a Mutation in the VRK1 Gene. *Am J Hum Genet* 2009; 85: 281–289.

Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015; 17: 405–424.

Rinaldi C, Grunseich C, Sevrioukova IF, Schindler A, Horkayne-Szakaly I, Lamperti C, et al. Cowchock Syndrome Is Associated with a Mutation in Apoptosis-Inducing Factor. *Am J Hum Genet* 2012; 91: 1095–1102.

Rose JM, Novoselov SS, Robinson PA, Cheetham ME. Molecular chaperone-mediated rescue of mitophagy by a Parkin RING1 domain mutant. *Hum Mol Genet* 2011; 20: 16–27.

Rossor AM, Carr AS, Devine H, Chandrashekar H, Pelayo-Negro AL, Pareyson D, et al. Peripheral neuropathy in complex inherited diseases: An approach to diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2017; 88: 846–863.

Rossor AM, Evans MRB, Reilly MM. A practical approach to the genetic neuropathies. *Pract Neurol* 2015; 15: 187–198.

Rossor AM, Kalmar B, Greensmith L, Reilly MM. The distal hereditary motor neuropathies. *J*



Neurol Neurosurg Psychiatry 2012; 83: 6–14.

Rossor AM, Morrow JM, Polke JM, Murphy SM, Houlden H, Laura M, et al. Pilot phenotype and natural history study of hereditary neuropathies caused by mutations in the HSPB1 gene. *Neuromuscul Disord* 2017; 27: 50–56.

Rossor AM, Oates EC, Salter HK, Liu Y, Murphy SM, Schule R, et al. Phenotypic and molecular insights into spinal muscular atrophy due to mutations in BICD2. *Brain* 2015; 138: 293–310.

Rossor AM, Tomaselli PJ, Reilly MM. Recent advances in the genetic neuropathies. *Curr Opin Neurol* 2016; 29: 537–548.

Salter CG, Beijer D, Hardy H, Barwick KES, Bower M, Mademan I, et al. Truncating SLC5A7 mutations underlie a spectrum of dominant hereditary motor neuropathies. *Neurol Genet* 2018; 4

Sanchez E, Darvish H, Mesias R, Taghavi S, Firouzabadi SG, Walker RH, et al. Identification of a Large DNAJB2 Deletion in a Family with Spinal Muscular Atrophy and Parkinsonism. *Hum Mutat* 2016; 37: 1180–1189.

Sancho P, Sánchez-Monteaagudo A, Collado A, Marco-Marín C, Domínguez-González C, Camacho A, et al. A newly distal hereditary motor neuropathy caused by a rare AIFM1 mutation. *Neurogenetics* 2017; 18: 245–250.

Saporta AS, Sottile SL, Miller LJ, Feely SME, Siskind CE, Shy ME. Charcot Marie Tooth (CMT) Subtypes and Genetic Testing Strategies. *Ann Neurol* 2011; 69: 22–33.

Saxe JP, Chen M, Zhao H, Lin H. Tdrkh is essential for spermatogenesis and participates in primary piRNA biogenesis in the germline. *EMBO J* 2013; 32: 1869–1885.

Schottmann G, Seelow D, Seifert F, Morales-Gonzalez S, Gill E, Von Au K, et al. Recessive REEP1 mutation is associated with congenital axonal neuropathy and diaphragmatic palsy. *Neurol Genet* 2015; 1

Scoto M, Rossor AM, Harms MB, Cirak S, Calissano M, Robb S, et al. Novel mutations expand the clinical spectrum of DYNC1H1-associated spinal muscular atrophy. *Neurology* 2015; 84: 668–679.

Sevilla T. Atrofas musculares espinales. *Neurología* 1996: 58–65.

Sevilla T, Cuesta A, Chumillas MJ, Mayordomo F, Pedrola L, Palau F, et al. Clinical, electrophysiological and morphological findings of Charcot-Marie-Tooth neuropathy with vocal cord palsy and mutations in the GDAP1 gene. *Brain* 2003; 126: 2023–33.

Shutova MS, Svitkina TM. Common and Specific Functions of Nonmuscle Myosin II Paralogs in Cells. *Biochem* 2018; 83: 1459–1468.

Silver JR. Familial spastic paraplegia with amyotrophy of the hands. *Ann Hum Genet* 1966; 30: 69–73.

Sivakumar K, Kyriakides T, Puls I, Nicholson GA, Funalot B, Antonellis A, et al. Phenotypic spectrum of disorders associated with glycyl-tRNA synthetase mutations. *Brain* 2005; 128: 2304–2314.

Sivera R, Espinós C, Vílchez JJ, Mas F, Martínez-Rubio D, Chumillas MJ, et al. Phenotypical features of the p.R120W mutation in the GDAP1 gene causing autosomal dominant Charcot-

- Marie-Tooth disease. *J Peripher Nerv Syst* 2010; 15: 334–344.
- Sivera R, Sevilla T, Vílchez JJ, Martínez-Rubio D, Chumillas MJ, Vázquez JF, et al. Charcot-Marie-Tooth disease: Genetic and clinical spectrum in a Spanish clinical series. *Neurology* 2013; 81: 1617–1625.
- Sommer C, Lauria G. Skin biopsy in the management of peripheral neuropathy. *Lancet Neurol* 2007; 6: 632–642.
- Souza PVS, Pinto WBVR, Aivazoglou LU, Cardoso FN, Aihara AY, Yamada AF, et al. Distal myopathy due to BICD2 mutations. *Clin Neurol Neurosurg* 2018; 165: 47–49.
- Splinter D, Tanenbaum ME, Lindqvist A, Jaarsma D, Flotho A, Yu K Lou, et al. Bicaudal D2, dynein, and kinesin-1 associate with nuclear pore complexes and regulate centrosome and nuclear positioning during mitotic entry. *PLoS Biol* 2010; 8
- Stevanin G, Santorelli FM, Azzedine H, Coutinho P, Chomilier J, Denora PS, et al. Mutations in SPG11, encoding spatacsin, are a major cause of spastic paraplegia with thin corpus callosum. *Nat Genet* 2007; 39: 366–372.
- Stoll M, Teoh H, Lee J, Reddel S, Zhu Y, Buckley M, et al. Novel motor phenotypes in patients with VRK1 mutations without pontocerebellar hypoplasia. *Neurology* 2016; 87: 65–70.
- Sumner CJ, D'Ydewalle C, Wooley J, Fawcett KA, Hernandez D, Gardiner AR, et al. A dominant mutation in FBXO38 causes distal spinal muscular atrophy with calf predominance. *Am J Hum Genet* 2013; 93: 976–983.
- Suraweera A, Lim YC, Woods R, Birrell GW, Nasim T, Becherel OJ, et al. Functional role for senataxin, defective in ataxia oculomotor apraxia type 2, in transcriptional regulation. *Hum Mol Genet* 2009; 18: 3384–3396.
- Synofzik M, Martinez-Carrera L a, Lindig T, Schöls L, Wirth B. Dominant spinal muscular atrophy due to BICD2: a novel mutation refines the phenotype. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2014; 85: 590–2.
- Syrbe S, Harms FL, Parrini E, Montomoli M, Mütze U, Helbig KL, et al. Delineating SPTAN1 associated phenotypes: From isolated epilepsy to encephalopathy with progressive brain atrophy. *Brain* 2017; 140: 2322–2336.
- Syriani E, Morales M, Gamez J. The p.E22G mutation in the Cu/Zn superoxide-dismutase gene predicts a long survival time. Clinical and genetic characterization of a seven-generation ALS1 Spanish pedigree. *J Neurol Sci* 2009; 285: 46–53.
- Takata RI, Speck Martins CE, Passosbueno MR, Abe KT, Nishimura AL, Dorvalina Da Silva M, et al. A new locus for recessive distal spinal muscular atrophy at Xq13.1-q21. *J Med Genet* 2004; 41: 224–229.
- Tang BS, Zhao G hua, Luo W, Xia K, Cai F, Pan Q, et al. Small heat-shock protein 22 mutated in autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease type 2L. *Hum Genet* 2005; 116: 222–224.
- Timmerman V, Clowes VE, Reid E. Overlapping molecular pathological themes link Charcot-Marie-Tooth neuropathies and hereditary spastic paraplegias. *Exp Neurol* 2013; 246: 14–25.
- Timmerman V, Raeymaekers P, Nelis E, De Jonghe P, Ceuterick C, Martin J-J, et al. Linkage analysis of distal hereditary motor neuropathy type II (distal HMN II) in a single pedigree. 1992

- Timmerman V, Strickland A V., Züchner S. Genetics of Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease within the frame of the human genome project success. *Genes (Basel)* 2014; 5: 13–32.
- Toft A, Birk S, Ballegaard M, Dunø M, Hjermind LE, Nielsen JE, et al. Peripheral neuropathy in hereditary spastic paraplegia caused by REEP1 variants. *J Neurol* 2019; 266: 735–744.
- Tsai PC, Soong BW, Mademan I, Huang YH, Liu CR, Hsiao CT, et al. A recurrent WARS mutation is a novel cause of autosomal dominant distal hereditary motor neuropathy. *Brain* 2017; 140: 1252–1266.
- Tullio-Pelet A, Salomon R, Hadj-Rabia S, Mugnier C, de Laet M-H, Chaouachi B, et al. Mutant WD-repeat protein in triple-A syndrome. *Nat Genet* 2000; 26: 332–335.
- Turner AJ, Elwyn Isaac R, Coates D, Isaac RE, Coates D. The neprilysin (NEP) family of zinc metalloendopeptidases: Genomics and function. *BioEssays* 2001; 23: 261–269.
- Udd B. Distal myopathies. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2014; 14
- Unger A, Dekomien G, G??ttsches A, Dreps T, Kley R, Tegenthoff M, et al. Expanding the phenotype of BICD2 mutations toward skeletal muscle involvement. *Neurology* 2016; 87: 2235–2243.
- Verhoeven K, De Jonghe P, Van De Putte T, Nelis E, Zwijsen A, Verpoorten N, et al. Slowed Conduction and Thin Myelination of Peripheral Nerves Associated with Mutant Rho Guanine-Nucleotide Exchange Factor 10. *Am J Hum Genet* 2003; 73: 926–932.
- Ververis A, Dajani R, Koutsou P, Aloqaily A, Nelson-Williams C, Loring E, et al. Distal hereditary motor neuronopathy of the Jerash type is caused by a novel SIGMAR1 c.500A>T missense mutation. *J Med Genet* 2020; 57: 178–186.
- Vester AA, Velez-Ruiz G, McLaughlin HM, Nisc Comparative Sequencing Program, Lupski JR, Talbot K, et al. A loss-of-function variant in the human histidyl-tRNA synthetase (HARS) gene is neurotoxic in vivo. *Hum Mutat* 2013; 34: 191–199.
- Vissers LELM, de Ligt J, Gilissen C, Janssen I, Steehouwer M, de Vries P, et al. A de novo paradigm for mental retardation. *Nat Genet* 2010; 42: 1109.
- Vulpe C, Levinson B, Whitney S, Packman S, Gitschier J. Isolation of a candidate gene for Menkes disease and evidence that it encodes a copper–transporting ATPase. *Nat Genet* 1993; 3: 7–13.
- Wan J, Steffen J, Yourshaw M, Mamsa H, Andersen E, Rudnik-Schöneborn S, et al. Loss of function of SLC25A46 causes lethal congenital pontocerebellar hypoplasia. *Brain* 2016; 139: 2877–2890.
- Wang B, Li X, Huang S, Zhao H, Liu J, Hu Z, et al. A novel WARS mutation (p.Asp314Gly) identified in a Chinese distal hereditary motor neuropathy family. *Clin Genet* 2019; 96: 176–182.
- Weedon MN, Hastings R, Caswell R, Xie W, Paszkiewicz K, Antoniadis T, et al. Exome sequencing identifies a DYNC1H1 mutation in a large pedigree with dominant Axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Am J Hum Genet* 2011; 89: 308–312.
- Weis J, Katona I, Müller-Newen G, Sommer C, Necula G, Hendrich C, et al. Small-fiber neuropathy in patients with ALS. 2011

Weterman MAJ, Kuo M, Kenter SB, Gordillo S, Karjosukarso DW, Takase R, et al. Hypermorphic and hypomorphic AARS alleles in patients with CMT2N expand clinical and molecular heterogeneities. *Hum Mol Genet* 2018; 27: 4036–4050.

Whittaker RG, Herrmann DN, Bansagi B, Hasan BAS, Lofra RM, Logigian EL, et al. Electrophysiologic features of SYT2 mutations causing a treatable neuromuscular syndrome. *Neurology* 2015; 85: 1964–1971.

Willemsen MH, Vissers LEL, Willemsen MAAP, van Bon BWM, Kroes T, de Ligt J, et al. Mutations in DYNC1H1 cause severe intellectual disability with neuronal migration defects. *J Med Genet* 2012; 49: 179–183.

Wilmshurst JM, Bye A, Rittey C, Adams C, Hahn AF, Ramsay D, et al. SEVERE INFANTILE AXONAL NEUROPATHY WITH RESPIRATORY FAILURE. 2001

Windpassinger C, Auer-Grumbach M, Irobi J, Patel H, Petek E, Hörl G, et al. Heterozygous missense mutations in BSCL2 are associated with distal hereditary motor neuropathy and Silver syndrome. *Nat Genet* 2004; 36: 271–276.

Windpassinger C, Wagner K, Petek E, Fischer R, Auer-Grumbach M. Refinement of the ‘Silver syndrome locus’ on chromosome 11q12-q14 in four families and exclusion of eight candidate genes. *Hum Genet* 2003; 114: 99–109.

Xu WY, Gu MM, Sun LH, Guo WT, Zhu HB, Ma JF, et al. A nonsense mutation in DHTKD1 causes charcot-marie-tooth disease type 2 in a large chinese pedigree. *Am J Hum Genet* 2012; 91: 1088–1094.

Yanagisawa H, Schluterman MK, Brekken RA. Fibulin-5, an integrin-binding matricellular protein: Its function in development and disease. *J Cell Commun Signal* 2009; 3: 337–347.

Young ID, Harper PS. Hereditary distal spinal muscular atrophy with vocal cord paralysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1980; 43: 413–418.

Zhai J, Lin H, Julien JP, Schlaepfer WW. Disruption of neurofilament network with aggregation of light neurofilament protein: A common pathway leading to motor neuron degeneration due to Charcot-Marie-Tooth disease-linked mutations in NFL and HSPB1. *Hum Mol Genet* 2007; 16: 3103–16.

Zhao C, Takita J, Tanaka Y, Setou M, Nakagawa T, Takeda S, et al. Charcot-Marie-Tooth Disease Type 2A Caused by Mutation in a Microtubule Motor KIF1B. *Cell* 2001; 105: 587–597.

Zhao Z, Hashiguchi A, Hu J, Sakiyama Y, Okamoto Y, Tokunaga S, et al. Alanine-tRNA synthetase mutation in a family with dominant distal hereditary motor neuropathy. *Neurology* 2012; 78: 1644-1649.

Zimoń M, Baets J, Almeida-Souza L, De Vriendt E, Nikodinovic J, Parman Y, et al. Loss-of-function mutations in HINT1 cause axonal neuropathy with neuromyotonia. *Nat Genet* 2012; 44: 1080–1083.

Zimoń M, Baets J, Auer-Grumbach M, Berciano J, Garcia A, Lopez-Laso E, et al. Dominant mutations in the cation channel gene transient receptor potential vanilloid 4 cause an unusual spectrum of neuropathies. *Brain* 2010; 133: 1798–1809.

Zong L, Guan J, Ealy M, Zhang Q, Wang D, Wang H, et al. Mutations in apoptosis-inducing factor cause X-linked recessive auditory neuropathy spectrum disorder. *J Med Genet* 2015; 52:

523–531.

Züchner S, Noureddine M, Kennerson M, Verhoeven K, Claeys K, Jonghe P De, et al. Mutations in the pleckstrin homology domain of dynamin 2 cause dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat Genet* 2005; 37: 289–294.

Züchner S, Wang G, Tran-Viet K-N, Nance MA, Gaskell PC, Vance JM, et al. REPORT Mutations in the Novel Mitochondrial Protein REEP1 Cause Hereditary Spastic Paraplegia Type 31. 2006



# **ANEXO: TRABAJOS PUBLICADOS**





## Artículo 1

Frasquet M, Rojas-García R, Argente-Escrig H, Vázquez-Costa JF, Muelas N, Vílchez JJ, Sivera R, Millet E, Barreiro M, Díaz-Manera J, Turon-Sans J, Cortés-Vicente E, Querol L, Ramírez-Jiménez L, Martínez-Rubio D, Sánchez-Monteagudo A, Espinós C, Sevilla T, Lupo V.

**Distal hereditary motor neuropathies: Mutation spectrum and genotype-phenotype correlation.**

Eur J Neurol. 2021 Apr;28(4):1334-1343.

doi: 10.1111/ene.14700. Epub 2021 Jan 10.

Regarding our article “Distal hereditary motor neuropathies: mutation spectrum and genotype-phenotype correlation” which was published in the European Journal of Neurology, volume 28, pages 1334-1343 (2021); we would like to report 2 errors: In family 81 we describe a novel *HSPB1* mutation as 'c.407G>C (p.Arg136His)', however the correct mutation is: NM\_001540:c.407G>A (p.Arg136Gln). In supplementary table 3, in family 90 we describe a novel *ARHGEF10* mutation as 'c.2602G>A (p.Glu868Gln)', however the correct mutation is: NM\_014629:c.2602G>C (p.Glu868Gln).

**Distal hereditary motor neuropathies: mutation spectrum and genotype-phenotype correlation**

Marina Frasquet<sup>1,2,3</sup>, MD; Ricard Rojas-García<sup>3,4,5</sup>, MD, PhD; Herminia Argente-Escrig<sup>2,3</sup>, MD; Juan Francisco Vázquez-Costa<sup>1,2,3,6</sup>, MD, PhD; Nuria Muelas<sup>1,2,3</sup>, MD, PhD; Juan Jesús Vílchez<sup>2,3</sup>, MD, PhD; Rafael Sivera<sup>7</sup>, MD, PhD; Elvira Millet<sup>8</sup>, MD; Marisa Barreiro<sup>2</sup>; Jordi Díaz-Manera<sup>3,4,5</sup>, MD, PhD; Janina Turon-Sans<sup>3,4,5</sup>, MD; Elena Cortés-Vicente<sup>3,4,5</sup>, MD, PhD; Luis Querol<sup>3,4,5</sup>, MD, PhD; Laura Ramírez-Jiménez<sup>9</sup>; Dolores Martínez-Rubio<sup>10,11</sup>; Ana Sánchez-Monteagudo<sup>10,11</sup>; Carmen Espinós<sup>10,11</sup>, PhD; Teresa Sevilla<sup>1,2,3,6</sup>\*, MD, PhD; Vincenzo Lupo<sup>10,11</sup>, PhD.

\* Corresponding Author

1. Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Neuromuscular Diseases Unit, Department of Neurology, Valencia, Spain.
2. Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Neuromuscular & Ataxias Research Group, Valencia, Spain.
3. Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER) Spain.
4. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Neuromuscular Diseases Unit, Department of Neurology. Barcelona, Spain.
5. Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.
6. Universitat de València, Department of Medicine, Valencia, Spain.
7. Hospital Francisc de Borja, Department of Neurology, Gandía, Spain.

8. Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Department of Clinical Neurophysiology, Valencia, Spain.
9. Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF), Department of Genomics and Translational Genetics, Valencia, Spain.
10. Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF), Unit of Genetics and Genomics of Neuromuscular and Neurodegenerative Disorders, Valencia, Spain
11. INCLIVA & IIS La Fe-CIPF, Rare Diseases Joint Units, Valencia, Spain.

**Correspondence to:**

Teresa Sevilla

Department of Neurology

Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Avenida Fernando Abril Martorell 106,  
46026 Valencia, Spain

[sevilla\\_ter@gva.es](mailto:sevilla_ter@gva.es)

Phone: (0034) 630037313.

Fax. (0034) 961246241

**Abstract**

**Background:** Distal hereditary motor neuropathies (dHMN) are a heterogeneous group of disorders characterized by degeneration of the motor component of peripheral nerves. Nowadays, only 15-32.5% of patients with dHMN are characterized genetically. Besides this, the prevalence of these genetic disorders is not well known. Recently, biallelic mutations in the sorbitol dehydrogenase gene (*SORD*) have been identified as a cause of dHMN, with an estimated frequency in undiagnosed cases of up to 10%.

**Methods:** In the present study, we included 163 patients belonging to 108 different families who were diagnosed with a dHMN and who underwent a thorough genetic screening that included next-generation sequencing and subsequent Sanger sequencing of *SORD*.

**Results:** Most probands were sporadic cases (62.3%) and the most frequent age of onset of symptoms was 2-10 years (28.8%). A genetic diagnosis was achieved in 37/108 (34.2%) families and 47.8% of all patients. The most frequent cause of distal hereditary motor neuropathies were mutations in *HSPB1* (10.4%), *GARS1* (9.8%), *BICD2* (8.0%) and *DNAJB2* (6.7%) genes. In addition, 3.1% of patients were found to be carriers of biallelic mutations in *SORD*. Mutations in another seven genes were also identified, although they were much less frequent. Eight new pathogenic mutations were detected and 17 patients without a definite genetic diagnosis carried variants of uncertain significance (VUS). The calculated minimum prevalence of dHMN was 2.3 per 100,000 individuals.

**Conclusions:** This study confirms the genetic heterogeneity of dHMN and that biallelic *SORD* mutations are a cause of dHMN in different populations.

Submission Type: Original Article

Title Character count: 90

Number of references: 45

Number of Tables: 1

Number of Figures: 3

Online Supplementary materials: supplementary table 1, supplementary table 2, supplementary table 3, supplementary table 4.

Word count of Abstract: 247

Word count of Paper: 4132

Total word count of the manuscript including title page, references, and structured abstract: 6332

**Running title:** Clinical and genetic spectrum of dHMN

**Keywords:** distal hereditary motor neuropathy; distal spinal muscular atrophy; Charcot-Marie-Tooth; *SORD*.

**Disclosure of Conflict of Interest statement:** The authors report no disclosures relevant to the manuscript

## INTRODUCTION

Distal hereditary motor neuropathies (dHMN), also known as distal spinal muscular atrophy (dSMA), are a heterogeneous group of disorders characterized by degeneration of the motor component of peripheral nerves, and they are included in the group of genetic neuropathies globally referred to as Charcot-Marie-Tooth (CMT) and related disorders (Reilly *et al.*, 2011). The classic phenotype of dHMN is characterized by a symmetrical, length-dependent motor neuropathy that causes distal muscle weakness and atrophy, and that is usually associated with foot deformities (Rossor *et al.*, 2012). Disease onset typically occurs in childhood or youth and the course is generally slowly progressive. However, there are congenital forms with a very slow progression (Rossor *et al.*, 2015b) while there are others that cause severe generalized weakness and great disability (Bertini *et al.*, 1989; Frasquet *et al.*, 2016). Besides these classical clinical presentations, dHMN may be associated with some additional features, such as predominantly upper limb onset and weakness (Gross *et al.*, 1998), vocal cord paresis (Young and Harper, 1980), diaphragmatic palsy (Bertini *et al.*, 1989) or pyramidal features (De Jonghe *et al.*, 2002). Some dHMN present with non-length dependent weakness, which might be restricted or predominant in the lower limbs (Spinal Muscular Atrophy Lower Extremity Dominant-SMALED) (Harms *et al.*, 2012; Peeters *et al.*, 2013). In 1993, Harding proposed a classification of dHMN into 7 subtypes based on the mode of inheritance and phenotype (Harding, 1993). Nowadays the original classification has been expanded with new phenotypes (Rossor *et al.*, 2012) and to date, more than 30 genes have been identified in association with different forms of dHMN (Pestronk, n.d.). These genes encode for proteins that fulfil different functions in motor neurons and axons (Drew *et al.*, 2011; Rossor *et al.*, 2016). Recently, biallelic mutations in the sorbitol dehydrogenase gene (*SORD*) have been identified as a cause of dHMN and axonal CMT (CMT2), with an estimated frequency in undiagnosed dHMN and CMT2 cases of up to 10% (Cortese *et al.*, 2020b). There is

certain clinical and genetic overlap between dHMN and CMT2, such that mutations in the same gene can cause either pure motor neuropathies (dHMN) or sensory-motor axonal neuropathies (CMT2), and some patients with a dHMN can manifest minor sensory symptoms or signs that might appear after years of disease evolution (Frasquet *et al.*, 2016). This same clinical and genetic overlap can be found between dHMN and other neurodegenerative disorders, such as amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and hereditary spastic paraparesis (HSP) (Timmerman *et al.*, 2013). Finally, dHMN may occasionally be the main feature of complex syndromes associated with other neurological or systemic features (Rossor *et al.*, 2017a). Even in the era of next-generation sequencing (NGS), only 15-32.5% of patients with dHMN are characterized genetically (Dierick *et al.*, 2008; Saporta *et al.*, 2011; Murphy *et al.*, 2012; Fridman *et al.*, 2015, Rossor *et al.*, 2015a; Bansagi *et al.*, 2017). Besides this, only a small number of clinical series of patients with dHMN have been reported (Dierick *et al.*, 2008; Saporta *et al.*, 2011; Murphy *et al.*, 2012; Fridman *et al.*, 2015; Bansagi *et al.*, 2017) and it is still necessary to perform systematic studies to better characterize patients with dHMN, as well as to shed light on the population distribution of these genetic disorders.

The aim of this study is to determine the minimum prevalence, the genetic cause and the clinical presentation of a series of patients with dHMN from two tertiary referral centres in Spain.

## **PATIENTS AND METHODS**

### **Patient enrolment and data collection**

This is an observational descriptive study that includes all the patients clinically diagnosed with dHMN from January 2000 to December 2019 at the neuromuscular clinic of two tertiary referral centres in Spain: Hospital Universitari i Politècnic La Fe



(Valencia) and Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona). All the patients were fully evaluated by experienced neurologists at the two participating centres and they underwent comprehensive genetic studies. Near relatives of index patients were assessed whenever possible and those who were identified as affected were also included in the study and designated as “secondary cases”. Sporadic cases were defined as those index patients with no affected relatives. We reviewed medical records and electrophysiological studies of all patients included in this work. Thus, from two large cohorts of patients with CMT-related inherited neuropathies, we selected and included patients who had a dHMN with no or only minor subclinical sensory changes on electrophysiological studies (Bansagi *et al.*, 2017). In all patients, electromyography (EMG) studies showed neurogenic chronic denervation and none of them presented myopathic changes. In families where the proband had been diagnosed with a dHMN, any other affected family member with clinical sensory impairment was also included in the study, and we classified these patients as “motor CMT2”. A subgroup of patients were classified as “dHMN plus” if the main feature was a motor neuropathy but they also had other neurological features like extrapyramidal or cerebellar symptoms, or systemic features (figure 1). Finally, six secondary cases with a confirmed genetic diagnosis who didn’t undergo electrophysiological studies were added to the cohort.

### **Genetic analysis**

DNA was obtained from peripheral blood. Ten out of 108 families were diagnosed by direct Sanger sequencing. The remaining 98 index patients were screened using whole exome sequencing (WES, n=8) or targeted NGS panels (n=90). In 84 cases, a custom capture-based gene panel using Sure Select QXT technology from Agilent technologies (Santa Clara, CA, USA) was used. Six cases were studied using an alternative custom panel, in which the technology combines a KAPA’s library preparation with SeqCapEZ probes (Roche, Basel, Switzerland). For all cases, NGS libraries were sequenced using an Illumina system (San Diego, CA, USA). A full list of

the genes studied using NGS panels is provided in supplementary table 1. A coverage analysis for NGS panels showed that over 99.5% of the target regions were sequenced to a read depth >20x. A mean normalized coverage was performed to evaluate copy-number variation (CNV). After variant annotation and filtering, variant classification was performed based on the American College of Medical Genetics (ACMG) guidelines (Richards *et al.*, 2015). Cases with pathological (P) or likely pathological (LP) mutations were considered as genetically confirmed. Cases were considered as negative if no changes were found, or variants were classified as likely benign (LB) or benign (B). Variants classified as P, LP or variants of uncertain significance (VUS) were validated by Sanger sequencing. Subsequently, patients with sporadic or recessive dHMN who were not genetically diagnosed after targeted NGS panels or WES, were screened for mutations in *SORD* gene. All the coding exons and intronic flanking regions of *SORD* (NM\_003104.6) were analysed by Sanger sequencing as described elsewhere (Cortese *et al.*, 2020b). In addition, 51 affected and 103 unaffected family members were included in this study for segregation analysis and clinical assessment.

Written informed consent was obtained from all the patients included in this study and the protocols were approved by the local research ethics committees.

## RESULTS

### Patient cohorts

A total of 163 patients from 108 different families were studied. Fifty-five per cent were male and the most frequent age of onset of symptoms was 2-10 years (n=47/163; 28.8%) (figure 2). In Valencia (series 1) we identified and studied 127 patients from 77 families with dHMN, all of whom were from the same catchment area: the Valencian Region, Eastern Spain, with a total population of 5,003,769 in the 2019 census. Of the patients in this series, 114 patients are currently alive and as such, in June 2020 the

minimum prevalence of dHMN in this region was calculated as 2.28 per 100,000 individuals. All families but three were Spanish. There were 11 secondary cases that were asymptomatic. The majority of probands were sporadic cases (n=48/77, 62.3 %). In 18/77 (23.4%) of the probands family tree showed an autosomal dominant (AD) pattern of inheritance, and in 11/77 (14.3%) of cases it was autosomal recessive (AR).

In Barcelona (series 2), 36 patients from 31 different families were studied. A total of 17/31 (54.8%) of the probands were sporadic cases, while in 7/31 (22.6%) of them family tree showed an AD pattern of inheritance and it was AR in 7/31 (22.6%).

### **Genetically confirmed cases**

Detailed clinical and genetic data from the patients with a definitive molecular genetic diagnosis are provided in supplementary table 2. The diagnosis rate in index cases with positive family history was 29/43 (67.4%), while it was 8/65 (12.3) in index patients who were sporadic cases. In Valencia, genetic diagnosis was achieved in 63/127 patients (49.6%) and 25/77 families (32.5%) (table 1 and figure 3). In 19 families, known pathogenic dHMN mutations were identified in eight genes, while in six families novel P or LP variants were found in five genes. Mutations in *GARS1*, *HSPB1*, *BICD2* and *DNAJB2* accounted for 79.4 % of the genetically confirmed cases (n=50/63) and biallelic mutations in *SORD* were found in three patients (2.4%). In Barcelona, the causative mutation was identified in 15/36 patients (41.7%) and 12/31 families (38.7%) (table 1 and figure 3). In eight families previously described pathogenic dHMN mutations were identified in six genes, while novel variants in four genes that segregated with the disease were detected in four families. Mutations in *HSPB1*, *AAAS*, *BICD2* and *DNAJB2* accounted for 66.7% of the genetically diagnosed patients (n=10/15). Biallelic mutations in *SORD* were found in two patients (5.5%).

Considering both sets of patients together, *HSPB1* mutations were the most frequent

cause of dHMN (10.4%). Specifically, all patients examined in Valencia (families 7, 8, 9, 10 and 11) and 2/3 patients of those evaluated in Barcelona (families 80 and 82) carried the NM\_001540.4:c.418C>G (p.Arg140Gly) change, while one patient carried the novel c.407G>C (p.Arg136His) mutation (family 81). In Valencia, all these families were distributed in a geographical cluster. All these patients presented a similar phenotype, characterised by a length-dependent pure motor or predominantly motor neuropathy that started in the lower limbs. In the majority of cases, the symptoms first appeared in the fourth or fifth decade of life (figure 2). There were secondary cases that presented clinical and electrophysiological sensory involvement the first time they were assessed and that were consequently classified as motor CMT2. Also, some patients who presented with a pure motor neuropathy developed sensory involvement as the disease progressed. The second most frequent cause of dHMN was the previously reported heterozygous NM\_002047.3:c.794C>T (p.Ser265Phe) change in *GARS1*, evident in 16 patients (9.8%), from two different families (families 5 and 6). These patients manifested a dHMN phenotype that frequently started or predominated in the distal upper limbs, which is also known as dHMN-V (Harding, 1993). In 13 patients (8.0%) from five families (1,2,3,4 and 86), five different mutations in *BICD2* (NM\_001003800.1) were identified: c.320C>T (p.Ser107Leu); c.1454T>G (p.Val485Gly); c.1669T>C (p.Tyr557His), c.2042C>T (p.Ser681Leu) and c.2108C>T (p.Thr703Met). We have previously reported four of these families (Frasquet *et al.*, 2020). Their phenotype was variable but in general, it could be classified as a classical SMALED type. In 11 patients (6.7%) from five families, homozygous pathogenic mutations in *DNAJB2* were detected, the patients from Valencia carrying the NM\_001039550.1:c.352+1G>A splice donor variant (families 15,16, 17 and 18), while the two siblings from Barcelona (family 79) carried a novel missense mutation c.125C>A (p.Ala42Asp). We have previously reported the phenotype of the families with the homozygous c.352+1G>A change (Frasquet *et al.*, 2016), which consisted in a severe dHMN with a relentless progression that is associated with later onset

sensory involvement. All the patients shared the same homozygous haplotype, which suggests that *DNAJB2* c.352+1G>A is a founder event in our population (Lupo *et al.*, 2016). Two patients, one with the c.352+1G>A change and the other carrying the c.125C>A mutation, presented a young-onset Parkinson disease (YOPD). Bi-allelic mutations in *AAAS* were detected in five patients (3.1%) with a “dHMN-plus” phenotype. Recessive mutations in this gene are a cause of *Triple A* or *Allgrove syndrome*. This condition was first defined by achalasia, alacrimia and adrenal insufficiency (Allgrove *et al.*, 1978), yet it may also be associated with a progressive neurological syndrome, including a predominantly motor neuropathy. Two siblings with the homozygous (NM\_015665.5):c.43C>A (p.Gln15\*) change in *AAAS* were diagnosed in Valencia (family 19) and three different changes in a homozygous state (NM\_015665.5): [1331+1G>A, c.211del (p.His71Ilefs\*23) and the novel c.1058T>C (p.Ile353Thr) variant] were identified in three probands from Barcelona (families 83, 84 and 85). All of our patients presented with a predominantly motor neuropathy with achalasia. Alacrimia and adrenal insufficiency were common features, but were not present in all five patients (supplementary table 2). Two index patients with a SMALED phenotype were confirmed to be carriers of *de novo* heterozygous mutations in *DYNC1H1*. Patient VLC58 (family 21) carried a previously reported NM\_001376.4:c.917A>G (p.His306Arg) mutation and patient VLC 59 (family 22) the novel NM\_001376.4:c.3527T>C (p.Leu1176Ser) change. We identified a heterozygous NM\_000454.4:c.65A>G (p.Glu22Gly) mutation in *SOD1* in two index patients with severe dHMN (families 12 and 13). This change was previously reported to cause a “pseudopolyneuritic form” of ALS, with predominantly distal lower limbs weakness and long survival time (Syriani *et al.*, 2009). None of our patients presented upper motor neuron signs after 6 or 17 years of disease evolution. In two siblings (family 20) with a childhood-onset and slowly progressive dHMN/motor CMT2 we detected two compound heterozygous mutations in *FIG4* (NM\_014845.5): the known pathogenic mutation c.122T>C (p.Ile41Thr) and the novel c.446+5G>C change. Compound

heterozygous c.1488C>A (p.Cys496\*) and c.1043T>C (p.Val348Ala) mutations in *IGHMBP2* (NM\_002180.2) caused Spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1 (SMARD1) in a young patient (family 23). The variant c.1043T>C (p.Val348Ala) was novel. We found the homozygous NM\_033409.3:c.394C>T (p.Arg132Trp) change in *SLC52A3* in a young woman with Brown-Vialetto-Van-Laere syndrome (family 87), who slightly improved after riboflavin therapy was started. One patient (family 88) with motor neuropathy and neuromuscular junction (NMJ) dysfunction carried the novel heterozygous NM\_177402.4:c.1082\_1096del (p.Asp361\_Leu365del) change in *SYT2*. This mutation apparently occurred *de novo* as neither of the unaffected parents carried the change. Mutations in *SYT2* have been described to cause motor neuropathy and/or a presynaptic NMJ disorder resembling Lambert-Eaton myasthenic syndrome (LEMS) (Herrmann *et al.*, 2014). Another patient (family 89) who was diagnosed with upper limb-predominant dHMN with pyramidal features carried the NM\_032667.6:c.269C>T (p.Ser90Leu) change in *BSCL2*. Compound heterozygous NM\_003384.2:c.599T>C (p.Leu200Pro) and c.1160G>A (p.Arg387His) mutations in *VRK1* caused juvenile-onset motor neuropathy with pyramidal tract signs in a 49-year-old woman (family 14). The c.599T>C variant was novel, while the c.1160G>A (p.Arg387His) change has been recently reported as a cause of dHMN in a patient with this variant in a compound heterozygous state (Liu *et al.*, 2020). We identified five patients (3.1%) from three independent families carrying biallelic mutations in *SORD* (NM\_003104.6). In family 29, two siblings carried the c.757delG (p.Ala253GlnfsTer27) variant in a compound heterozygous state with the c.458C>A (p.Ala132Asp) change. These same compound heterozygous mutations in *SORD* were found in two affected siblings from family 98. The proband from family 29 (VLC66) presented with childhood onset classical dHMN. She presented a slowly progressive course with severe weakness in distal lower limbs and mild weakness in proximal muscles of lower limbs. In this patient, minor sensory findings which were not previously present were noted on clinical examination after 40 years of disease evolution. One of her siblings (VLC128) also carried both changes in

*SORD*. She was asymptomatic, but on examination she presented foot deformities and atrophy of intrinsic foot muscles with mild difficulty walking on heels. Electrophysiological studies in this latter patient showed reduced compound motor unit action potentials in distal muscles of lower limbs and chronic neurogenic chronic denervation on EMG. These two siblings (VLC66 and VLC128) also harboured the NM\_138361.5:c.1298C>T (p.Ser433Leu) change in *LRSAM1*, previously reported as a LP variant; (Laššuthová *et al.*, 2016) however, the patients' unaffected father also carried this variant. In family 98, both affected patients (BCN 22 and BCN 23) presented a similar phenotype which consisted in dHMN in association with pes cavus and brisk reflexes, with first symptoms noted in the second decade of life. Patient VLC71 from family 34 was homozygous for the variant (p.Ala253GlnfsTer27) in *SORD*. She originated from Morocco and there was consanguinity in her family. She noted first symptoms in her third decade of life and she presented a classical dHMN phenotype. As disease progressed she developed mild weakness in proximal lower limbs and distal upper limbs as well as sensory symptoms.

### **Inconclusive genetic studies**

Globally, the final genetic diagnosis was considered to be inconclusive in 17 patients as they harboured variants that could not be definitely classified as P/LP or B/LB and thus, are reported as VUS (supplementary table 3). Among these, only two patients carried genetic changes that correlated with both the previously described phenotype and the mode of inheritance. Patient VLC61 (family 24) presented with childhood onset mild dHMN with lower limb involvement, foot deformity and a static course. He carried the novel change in *DYNC1H1*, NM\_001376.4:c.11489A>G (p.Gln3830Arg). However, no segregation studies could be performed and *in silico* pathogenic prediction algorithms were controversial (tolerated vs deleterious), leading to this change being classified as VUS. Patient BCN17 (family 93) presented a late-onset dHMN and carried the variant NM\_014365.2:c.65G>A, p.Arg22Gln in *HSPB8*, which *in silico* predictors

estimated would have a deleterious effect. However, this change was annotated in the gnomAD database v2.1.1 and v3 (2/251428 and 1/143318 allele counts, respectively), thus questioning its causal involvement in the disease. Altogether, six patients (families 30, 31, 32, 33, 35 and 96) carried heterozygous variants in genes associated with AR inherited neuropathies but with no variant identified in the second allele (supplementary table 3). Relative read-depth analysis of gene panels did not detect any copy number alterations either.

### **Negative studies**

Globally, 68/163 patients (41.7%) from 54/108 families (50%) were considered here to have a negative genetic diagnosis as no candidate variants or only benign variants were found after NGS studies or they were classified as LB. The latter included 24 variants initially classified as VUS, but that were ruled out as candidate mutations after conducting segregation studies (supplementary table 4). Among all the negative cases there were 29 patients with AD or AR inheritance and one sporadic case with consanguineous parents.

## **DISCUSSION**

Collaborative clinical research is crucial to study rare diseases and here we present two series of patients with dHMN from Spain. Together, we have studied a total of 163 cases from 108 different families. Since one of the series involved patients from across the entire Valencian Community we could calculate a minimum prevalence in this geographic region of 2.3 per 100,000 individuals, which is very similar to that recently calculated in the North of England (2.14 per 100,000 individuals) (Bansagi *et al.*, 2017). A thorough genetic screening including the recently identified causative gene, *SORD* (Cortese *et al.*, 2020b), was performed on our patients and a molecular diagnosis was achieved in 47.8% (78/163) of patients and 34.2% (37/108) of the families. These rates



of diagnosis are similar to the most recent published series studied by NGS techniques (Bansagi *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2020), which highlights the fact that the majority of patients with dHMN remain without genetic diagnosis. Structural and copy number variants (SVs and CNVs), as well as the identification of deep intronic mutations and/or exonic variants in undiscovered genes could be behind the phenotype of unresolved dHMN cases (Pipis *et al.*, 2019). CNVs can be explored by gene panel sequencing, as shown in a recent study (Cortese *et al.*, 2020a). However, in our cohort, there were no alterations to suggest the presence of exonic CNVs after performing a relative read-depth analysis within the samples sequenced by gene panel. In this series of patients, P and LP changes were identified in 14 different genes and to our knowledge, eight of these mutations are reported here for the first time.

Here, the patients studied were from two adjacent regions in Eastern Spain where the population has a similar background. Predictably, we found mutations in common genes (*AAAS*, *BICD2*, *HSPB1*, *DNAJB2*, *SORD*), and even a common change, c.418C>G (p.Arg140Gly), in *HSPB1*, although there was also an important heterogeneity among the other genes identified. In this study, the most frequent cause of dHMN were mutations in the *HSPB1* gene (10.4%). *HSPB1* mutations have been formerly reported as a frequent cause of dHMN (Dierick *et al.*, 2008; Capponi *et al.*, 2011) and the c.418C>G change in particular has been detected previously in patients originating from India (Houlden *et al.*, 2008). In an Italian cohort of 64 dHMN patients, 5 of them (8%) carried mutations in *HSPB1* (Capponi *et al.*, 2011) and in a French cohort of dHMN, mutations in *HSPB1* were identified in 28/510 of index patients (5.5%) (Echaniz-Laguna *et al.*, 2017). The second most frequent cause of dHMN was the c.794C>T (p.Ser265Phe) change in *GARS1* (9.8%), which was detected in 16 patients. Mutations in *BICD2* (8.0%) were detected in 11 patients from Valencia and in two patients from Barcelona, confirming that mutations in this gene are a frequent cause of dHMN in different populations (Bansagi *et al.*, 2017). In 11 patients (6.7%) from five

families, homozygous pathogenic mutations in *DNAJB2* were detected. Two of these patients presented YOPD. The association between parkinsonism and *DNAJB2* has been reported previously in several patients who carried bi-allelic mutations in this gene (Frasquet *et al.*, 2016; Sanchez *et al.*, 2016). Indeed, this association could be explained by the role of the DNAJB2 protein, which acts as a co-chaperone that prevents the aggregation of misfolded proteins like SOD1 (Blumen *et al.*, 2012) and PRKN (Rose *et al.*, 2011), the latter being related to juvenile parkinsonism (Kitada *et al.*, 1998). Unexpectedly, bi-allelic mutations in *AAAS* (3.1%) were also a frequent cause of “dHMN-plus” in our series. Nevertheless, all patients carried homozygous changes and, as reported before, there is a high proportion of recessive inheritance and consanguinity in our population (Sivera *et al.*, 2013).

In our patient cohort, five NGS-unsolved cases were later found to be carriers of biallelic mutations in the recently identified CMT2/dHMN-causing gene, *SORD*. These findings have raised our series' diagnostic rate from 44.7% to 47.8% as 3.1% (5/163) of patients and 2.8% (3/108) of families carried pathogenic mutations in this gene. Mutations in *SORD* have been recently described as the most frequent cause of recessive inherited neuropathies. It has been hypothesized that they were not identified until now because widely used NGS analysis pipelines had difficulties to call variants in *SORD* due to the existence of the homologous *SORD2P* pseudogene (Cortese *et al.*, 2020b). In the first report of *SORD*-associated neuropathy, 45 patients were found to harbor biallelic mutations in *SORD* (NM\_003104.6) and all of them carried the c.757delG (p.Ala253GlnfsTer27) variant in homozygosity or in a compound heterozygous state with a second likely pathogenic variant (Cortese *et al.*, 2020b). Our results are in line with this, since all our patients carried the (p.Ala253GlnfsTer27) variant in a heterozygous state with a second mutated allele or in homozygosity. In our population *SORD* mutations were not as frequent as expected, nevertheless in this work we have only included probands with dHMN and not with CMT2, unlike the

original studied cohorts. The intrinsic heterogeneity of dHMN was evident in our sample, as reflected by the notable differences in the distribution of mutations that exist among the different series of patients reported. In the largest reported series of dHMN with 117 index patients with an AD pattern of inheritance (Dierick *et al.*, 2008), seven dHMN genes were studied and 17 index patients were diagnosed genetically, with all the mutations situated in only four genes (*BSCL2*, *HSPB8*, *HSPB1* and *SETX*). In one of the most recent reported series of dHMN, by Bansagi *et al.* (Bansagi *et al.*, 2017), pathogenic and possibly pathogenic mutations were identified in 24 different genes, of which only seven genes were common to our series (*BICD2*, *DYNC1H1*, *FIG4*, *GARS1*, *IGHMBP2*, *SLC52A* and *SYT2*). Noteworthy, in our patients with definite genetic diagnosis, we did not find any causative mutation in *AARS1*, which was a frequent cause of dHMN in the series by Bansagi *et al.*, where all the patients carried the same c.986G>A (p.Arg329His) founder mutation (Bansagi *et al.*, 2015a). In a recent series of dHMN from China, mutations in *HSPB1* were the most frequent cause of dHMN and among the additional causative genes, 6 of them are shared with our series (*GARS1*, *DNAJB2*, *IGHMBP2*, *BSCL2*, *DYNC1H1* and *VRK1*) (Liu *et al.*, 2020).

The known clinical and genetic overlap among CMT2 and dHMN, and the coexistence of both phenotypes in the same family whose members carry the same pathogenic mutation was also evident in our population. In particular, we observed how sensory impairment tends to appear years later than motor involvement in patients carrying mutations in *DNAJB2* or *HSPB1*. Similarly, our results show how dHMN overlap with ALS and HSP as we identified pathogenic mutations in *SOD1* in two index patients with dHMN, and another patient carried a pathogenic variant in *BSCL2*, which is related to different phenotypes included in a continuum syndrome that ranges from neuropathy to a pure HSP (Irobi *et al.*, 2004a). The overlap between dHMN and hereditary forms of ALS and complex HSP is not surprising, as they share some pathogenic mechanisms (Timmerman *et al.*, 2013). From a clinical point of view, there is also an overlap

between dHMN and distal myopathies, as the latter also cause distal muscle weakness and atrophy (Udd, 2014). In addition, some families diagnosed with dHMN carry mutations in genes that have been previously associated with myopathy (Previtali *et al.*, 2019). Generally, EMG studies are very useful differentiating both disorders since in dHMN, EMG shows chronic denervation, while in distal myopathies EMG reveals myopathic changes. However, in some specific cases EMG findings can be mixed or misinterpreted. In this study, EMG studies of all patients showed chronic denervation and we did not include patients with myopathic changes recorded on EMG.

In 34.2% (37/108) of index cases genetic changes were identified that were classified as VUS. The proportion of VUS and their criteria may be controversial in the different databases consulted, and the absence of functional studies fails to clarify this issue. Segregation testing in affected and unaffected family members here led to the reclassification of VUS to LB in 54.0% (20/37) of families, emphasizing the importance of conducting such studies whenever possible.

In conclusion, dHMN are rare diseases and the causative genes are quite heterogeneous in different series of patients. In this study, the diagnosis rate is 47.8% and the calculated minimum prevalence is at least 2.3 per 100,000 individuals. The most frequent genetic causes of dHMN in our population are mutations in the *HSPB1*, *GARS1*, *BICD2* and *DNAJB2* genes, while 3.1% of patients carry biallelic mutations in *SORD*. The majority of patients are sporadic cases and the most frequent age of clinical onset is between 2 and 10 years. Segregation testing has been highly beneficial to reclassify the VUS identified in our cohort, however most patients remain without a molecular diagnosis after a thorough genetic study. Finally, there is a certain genetic and clinical overlap between dHMN and CMT2, and other neurodegenerative diseases like ALS and HSP.

**Acknowledgments**

The authors thank the patients for their willingness to collaborate in this study. The samples utilized in this study were provided by the 'Biobanco La Fe' (PT17/ 0015/0043) and CIBERER Biobank and they were processed following standard operating procedures with the appropriate approval of the relevant Ethics and Scientific Committees.

***Author's contributions***

TS, VL and MF designed the study. TS directed the project. MF, RRG, HAE, JFVC, NM, JJV, RS, EM, MB,JDM, JTS, ECV, LQ and TS recruited patients and gathered clinical information for the study. VL and CE designed and performed genetic studies and variant analysis. LRJ, DMR and ASM performed genetic studies. MF, VL and TS wrote the paper. All authors critically reviewed the paper.

**Study funding:**

This Project was funded by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)–ERDF (grants PI12/00946 and PI16/00403 to T.S.; and grant PI16 /00316 to NM and JJV) and Generalitat Valenciana (grant PROMETEO/ 2018/135 to T.S. and C.E.; and grant GV19/044 to V. L.). M.F. and H.A-E. received a grant from the Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (2015/0085 and 2017/0351, respectively). A.S.M. received a grant from the Foundation Per Amor a l'Art (FPAA). JFVC is funded by a grant of the ISCIII (JR19/00030, PI Vázquez). Part of the equipment employed in this work has been funded by Generalitat Valenciana and co-financed with ERDF funds (OP ERDF of Comunitat Valenciana 2014-2020). The 'CIBERER' is an initiative of the ISCIII.

### **Ethics approval and consent to participate**

Written informed consent was obtained from all the patients and relatives included in this study and the protocols were approved by the Institutional Review Board and Ethics Committee at the Hospital Universitari i Politècnic La Fe (Valencia, Spain) and Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona, Spain).

Patient consent for publication

Not applicable.

### **Availability of data and materials**

*The data that support the findings of this study are available from the corresponding author, upon reasonable request.*

## REFERENCES

1. [Reilly MM, Murphy SM, Laurá M. Charcot-Marie-Tooth disease. \*J Peripher Nerv Syst.\* 2011;16\(1\):1-14. doi:10.1111/j.1529-8027.2011.00324.x](#)
2. [Rossor AM, Kalmar B, Greensmith L, Reilly MM. The distal hereditary motor neuropathies. \*J Neurol Neurosurg Psychiatry.\* 2012;83\(1\):6-14. doi:10.1136/jnnp-2011-300952](#)
3. [Rossor AM, Oates EC, Salter HK, et al. Phenotypic and molecular insights into spinal muscular atrophy due to mutations in BICD2. \*Brain.\* 2015;138\(2\):293-310. doi:10.1093/brain/awu356](#)
4. [Frasquet M, Chumillas MJ, Vilchez JJ, et al. Phenotype and natural history of inherited neuropathies caused by HSN1 c.352+1G>A mutation. \*J Neurol Neurosurg Psychiatry.\* 2016;87\(11\):1265-1268. doi:10.1136/jnnp-2015-312890](#)
5. [Bertini E, Gadisseux JL, Palmieri G, et al. Distal infantile spinal muscular atrophy associated with paralysis of the diaphragm: A variant of infantile spinal muscular atrophy. \*Am J Med Genet.\* 1989;33\(3\):328-335. doi:10.1002/ajmg.1320330309](#)
6. [Gross DW, Rajput AH, Yeung M. Distal hereditary upper limb muscular atrophy. \*J Neurol Neurosurg Psychiatry.\* 1998;64:217-220. doi:10.1136/jnnp.64.2.217](#)
7. [Young ID, Harper PS. Hereditary distal spinal muscular atrophy with vocal cord paralysis. \*J Neurol Neurosurg Psychiatry.\* 1980;43\(5\):413-418. doi:10.1136/jnnp.43.5.413](#)
8. [De Jonghe P, Auer-Grumbach M, Irobi J, et al. Autosomal dominant juvenile amyotrophic lateral sclerosis and distal hereditary motor neuronopathy with pyramidal tract signs: synonyms for the same disorder? \*Brain.\* 2002;125\(Pt 6\):1320-1325. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12023320>](#)

9. [Peeters K, Litvinenko I, Asselbergh B, et al. Molecular defects in the motor adaptor BICD2 cause proximal spinal muscular atrophy with autosomal-dominant inheritance. \*Am J Hum Genet.\* 2013;92\(6\):955-964. doi:10.1016/j.ajhg.2013.04.013](#)
10. [Harms MB, Ori-McKenney KM, Scoto M, et al. Mutations in the tail domain of DYNC1H1 cause dominant spinal muscular atrophy. \*Neurology.\* 2012;78\(22\):1714-1720. doi:10.1212/WNL.0b013e3182556c05](#)
11. [Harding AE. Inherited neuronal atrophy and degeneration predominantly of lower motor neurons. In: Dyck PJ, Thomas PK, Griffin JW LP, Podulso JF, eds. \*Peripheral Neuropathy.\* 3rd ed. WB Saunders; 1993:1051–1064.](#)
12. [Pestronk A. NEUROMUSCULAR DISEASE CENTER , Washington University, St. Louis, MO USA. <https://neuromuscular.wustl.edu/index.html>](#)
13. [Drew AP, Blair IP, Nicholson GA. Molecular Genetics and Mechanisms of Disease in Distal Hereditary Motor Neuropathies: Insights Directing Future Genetic Studies. \*Curr Mol Med.\* 2011;11\(8\):650-665.](#)
14. [Rossor AM, Tomaselli PJ, Reilly MM. Recent advances in the genetic neuropathies. \*Curr Opin Neurol.\* 2016;29\(5\):537-548. doi:10.1097/WCO.0000000000000373](#)
15. [Cortese A, Zhu Y, Rebelo AP, et al. Biallelic mutations in SORD cause a common and potentially treatable hereditary neuropathy with implications for diabetes. \*Nat Genet.\* 2020;52\(5\):473-481. doi:10.1038/s41588-020-0615-4](#)
16. [Timmerman V, Clowes VE, Reid E. Overlapping molecular pathological themes link Charcot-Marie-Tooth neuropathies and hereditary spastic paraplegias. \*Exp Neurol.\* 2013;246:14-25. doi:10.1016/j.expneurol.2012.01.010](#)
17. [Rossor AM, Carr AS, Devine H, et al. Peripheral neuropathy in complex inherited](#)



- [diseases: An approach to diagnosis. \*J Neurol Neurosurg Psychiatry\*. 2017;88\(10\):846-863. doi:10.1136/jnnp-2016-313960](#)
18. [Bansagi B, Griffin H, Whittaker RG, et al. Genetic heterogeneity of motor neuropathies. \*Neurology\*. 2017;88\(13\):1226-1234. doi:10.1212/WNL.0000000000003772](#)
19. [Saporta AS, Sottile SL, Miller LJ, Feely SME, Siskind CE, Shy ME. Charcot Marie Tooth \(CMT\) Subtypes and Genetic Testing Strategies. \*Ann Neurol\*. 2011;69\(1\):22-33. doi:10.1002/ana.22166](#)
20. [Murphy SM, Laura M, Fawcett K, et al. Charcot-Marie-Tooth disease: frequency of genetic subtypes and guidelines for genetic testing. \*J Neurol Neurosurg Psychiatry\*. 2012;83\(7\):706-710. doi:10.1136/jnnp-2012-302451](#)
21. [Fridman V, Bundy B, Reilly MM, et al. CMT subtypes and disease burden in patients enrolled in the Inherited Neuropathies Consortium natural history study: A cross-sectional analysis. \*J Neurol Neurosurg Psychiatry\*. 2015;86\(8\):873-878. doi:10.1136/jnnp-2014-308826](#)
22. [Dierick I, Baets J, Irobi J, et al. Relative contribution of mutations in genes for autosomal dominant distal hereditary motor neuropathies: A genotype-phenotype correlation study. \*Brain\*. 2008;131\(5\):1217-1227. doi:10.1093/brain/awn029](#)
23. [Rossor AM, Evans MRB, Reilly MM. A practical approach to the genetic neuropathies. \*Pract Neurol\*. 2015;15\(3\):187-198. doi:10.1136/practneurol-2015-001095](#)
24. [Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular](#)

- [Pathology. \*Genet Med.\* 2015;17\(5\):405-424. doi:10.1038/gim.2015.30](#)
25. [Frasquet M, Camacho A, Vílchez R, et al. Clinical spectrum of BICD2 mutations. \*Eur J Neurol.\* 2020;27\(7\):1327-1335. doi:10.1111/ene.14173](#)
26. [Lupo V, García-García F, Sancho P, et al. Assessment of Targeted Next-Generation Sequencing as a Tool for the Diagnosis of Charcot-Marie-Tooth Disease and Hereditary Motor Neuropathy. \*J Mol Diagnostics.\* 2016;18\(2\):225-234. doi:10.1016/j.jmoldx.2015.10.005](#)
27. [Allgrove J, Clayden GS, Grant DB, Macaulay JC. Familial glucocorticoid deficiency with achalasia of the cardia and deficient tear production. \*Lancet.\* 1978;311\(8077\):1284-1286. doi:https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(78\)91268-0](#)
28. [Syriani E, Morales M, Gamez J. The p.E22G mutation in the Cu/Zn superoxide-dismutase gene predicts a long survival time. Clinical and genetic characterization of a seven-generation ALS1 Spanish pedigree. \*J Neurol Sci.\* 2009;285\(1-2\):46-53. doi:10.1016/j.jns.2009.05.011](#)
29. [Herrmann DN, Horvath R, Sowden JE, et al. Synaptotagmin 2 mutations cause an autosomal-dominant form of lambert-eaton myasthenic syndrome and nonprogressive motor neuropathy. \*Am J Hum Genet.\* 2014;95\(3\):332-339. doi:10.1016/j.ajhg.2014.08.007](#)
30. [Liu X, Duan X, Zhang Y, Sun A, Fan D. Molecular analysis and clinical diversity of distal hereditary motor neuropathy. \*Eur J Neurol.\* 2020;27\(7\):1319-1326. doi:10.1111/ene.14260](#)
31. [Laššuthová P, Šafka Brožková D, Krůtová M, et al. Improving diagnosis of inherited peripheral neuropathies through gene panel analysis. \*Orphanet J Rare Dis.\* 2016;11\(1\):118. doi:10.1186/s13023-016-0500-5](#)
32. [Pipis M, Rossor AM, Laura M, Reilly MM. Next-generation sequencing in](#)

- [Charcot–Marie–Tooth disease: opportunities and challenges. \*Nat Rev Neurol.\* 2019;15\(11\):644-656. doi:10.1038/s41582-019-0254-5](#)
33. [Cortese A, Wilcox JE, Polke JM, et al. Targeted next-generation sequencing panels in the diagnosis of Charcot-Marie-Tooth disease. \*Neurology.\* 2020;94\(1\):e51-e61. doi:10.1212/WNL.0000000000008672](#)
34. [Capponi S, Geroldi A, Fossa P, et al. HSPB1 and HSPB8 in inherited neuropathies: study of an Italian cohort of dHMN and CMT2 patients. \*J Peripher Nerv Syst.\* 2011;16\(4\):287-294. doi:10.1111/j.1529-8027.2011.00361.x](#)
35. [Houlden H, Laura M, Wavrant-De Vrièze F, Blake J, Wood N, Reilly MM. Mutations in the HSP27 \(HSPB1\) gene cause dominant, recessive, and sporadic distal HMN/CMT type 2. \*Neurology.\* 2008;71\(21\):1660-1668. doi:10.1212/01.wnl.0000319696.14225.67](#)
36. [Echaniz-Laguna A, Geuens T, Petiot P, et al. Axonal Neuropathies due to Mutations in Small Heat Shock Proteins: Clinical, Genetic and Functional Insights into Novel Mutations. \*Hum Mutat.\* 2017;38\(5\):556-568. doi:10.1002/humu.23189](#)
37. [Sanchez E, Darvish H, Mesias R, et al. Identification of a Large DNAJB2 Deletion in a Family with Spinal Muscular Atrophy and Parkinsonism. \*Hum Mutat.\* 2016;37\(11\):1180-1189. doi:10.1002/humu.23055](#)
38. [Blumen SC, Astord S, Robin V, et al. A rare recessive distal hereditary motor neuropathy with HSP1 chaperone mutation. \*Ann Neurol.\* 2012;71\(4\):509-519. doi:10.1002/ana.22684](#)
39. [Rose JM, Novoselov SS, Robinson PA, Cheetham ME. Molecular chaperone-mediated rescue of mitophagy by a Parkin RING1 domain mutant. \*Hum Mol Genet.\* 2011;20\(1\):16-27. doi:10.1093/hmg/ddq428](#)

40. [Kitada T, Asakawa S, Hattori N, et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. \*Nature\*. 1998;392\(6676\):605-608. doi:10.1038/33416](#)
41. [Sivera R, Sevilla T, Vílchez JJ, et al. Charcot-Marie-Tooth disease: Genetic and clinical spectrum in a Spanish clinical series. \*Neurology\*. 2013;81\(18\):1617-1625. doi:10.1212/WNL.0b013e3182a9f56a](#)
42. [Bansagi B, Antoniadi T, Burton-Jones S, et al. Genotype/phenotype correlations in AARS-related neuropathy in a cohort of patients from the United Kingdom and Ireland. \*J Neurol\*. 2015;262\(8\):1899-1908. doi:10.1007/s00415-015-7778-4](#)
43. [Irobi J, Van Den Bergh P, Merlini L, et al. The phenotype of motor neuropathies associated with BSCL2 mutations is broader than Silver syndrome and distal HMN type V. \*Brain\*. 2004;127\(9\):2124-2130. doi:10.1093/brain/awh232](#)
44. [Udd B. Distal myopathies. \*Curr Neurol Neurosci Rep\*. 2014;14\(3\). doi:10.1007/s11910-013-0434-4](#)
45. [Previtali SC, Zhao E, Lazarevic D, et al. Expanding the spectrum of genes responsible for hereditary motor neuropathies. \*J Neurol Neurosurg Psychiatry\*. 2019;90\(10\):1171-1179. doi:10.1136/jnnp-2019-320717](#)

## **TABLE LEGENDS**

Table 1. Genetic distribution in our dHMN patient series

## **FIGURE LEGENDS**

Figure 1. Diagnostic flow chart and genetic diagnosis rate according to phenotype

Figure 2. Distribution of the patients according to age of disease onset and the causative mutation

Figure 3. Genetic distribution in series 1 (A and B) and series 2 (C and D)

## **ONLINE SUPPLEMENTARY MATERIAL**

Supplementary table 1. List of the genes included in the CMT/HMN custom gene panels used in Valencia and Barcelona.

Supplementary table 2. Clinical and genetic data from the patients with a definitive molecular genetic diagnosis.

Supplementary table 3. Patients with inconclusive genetic diagnosis and identified VUS.

Supplementary table 4. List of identified VUS that were reclassified as likely benign (LB) after performing segregation analysis in healthy or affected family members.

**Table 1.** Genetic distribution in our dHMN patient series

	Both centres			Valencia			Barcelona		
	N=163	% of all cases	% of genetically confirmed	N=127	% of all cases	% of genetically confirmed	N=36	% of all cases	% of genetically confirmed
Genetically unconfirmed	85	52.1		64	50.4		21	58.3	
Genetically confirmed	78	47.9		63	49.6		15	41.7	
<i>HSPB1</i>	17	10.4	21.8	14	11.0	22.2	3	8.3	20.0
<i>GARS1</i>	16	9.8	20.5	16	12.6	25.4	0	0.0	0.0
<i>BICD2</i>	13	8.0	16.7	11	8.7	17.5	2	5.6	13.3
<i>DNAJB2</i>	11	6.7	14.1	9	7.1	14.3	2	5.6	13.3
<i>AAAS</i>	5	3.1	6.4	2	1.6	3.2	3	8.3	20.0
<i>SORD</i>	5	3.1	6.4	3	2.4	4.8	2	5.6	13.3
<i>SOD1</i>	2	1.2	2.6	2	1.6	3.2	0	0.0	0.0
<i>FIG4</i>	2	1.2	2.6	2	1.6	3.2	0	0.0	0.0
<i>DYNC1H1</i>	2	1.2	2.6	2	1.6	3.2	0	0.0	0.0
<i>VRK1</i>	1	0.6	1.3	1	0.8	1.6	0	0.0	0.0
<i>SLC52A3</i>	1	0.6	1.3	0	0.0	0.0	1	2.8	6.7
<i>SYT2</i>	1	0.6	1.3	0	0.0	0.0	1	2.8	6.7
<i>BSCL2</i>	1	0.6	1.3	0	0.0	0.0	1	2.8	6.7
<i>IGHMBP2</i>	1	0.6	1.3	1	0.8	1.6	0	0.0	0.0

Figure 1. Diagnostic flow chart and genetic diagnosis rate according to phenotype

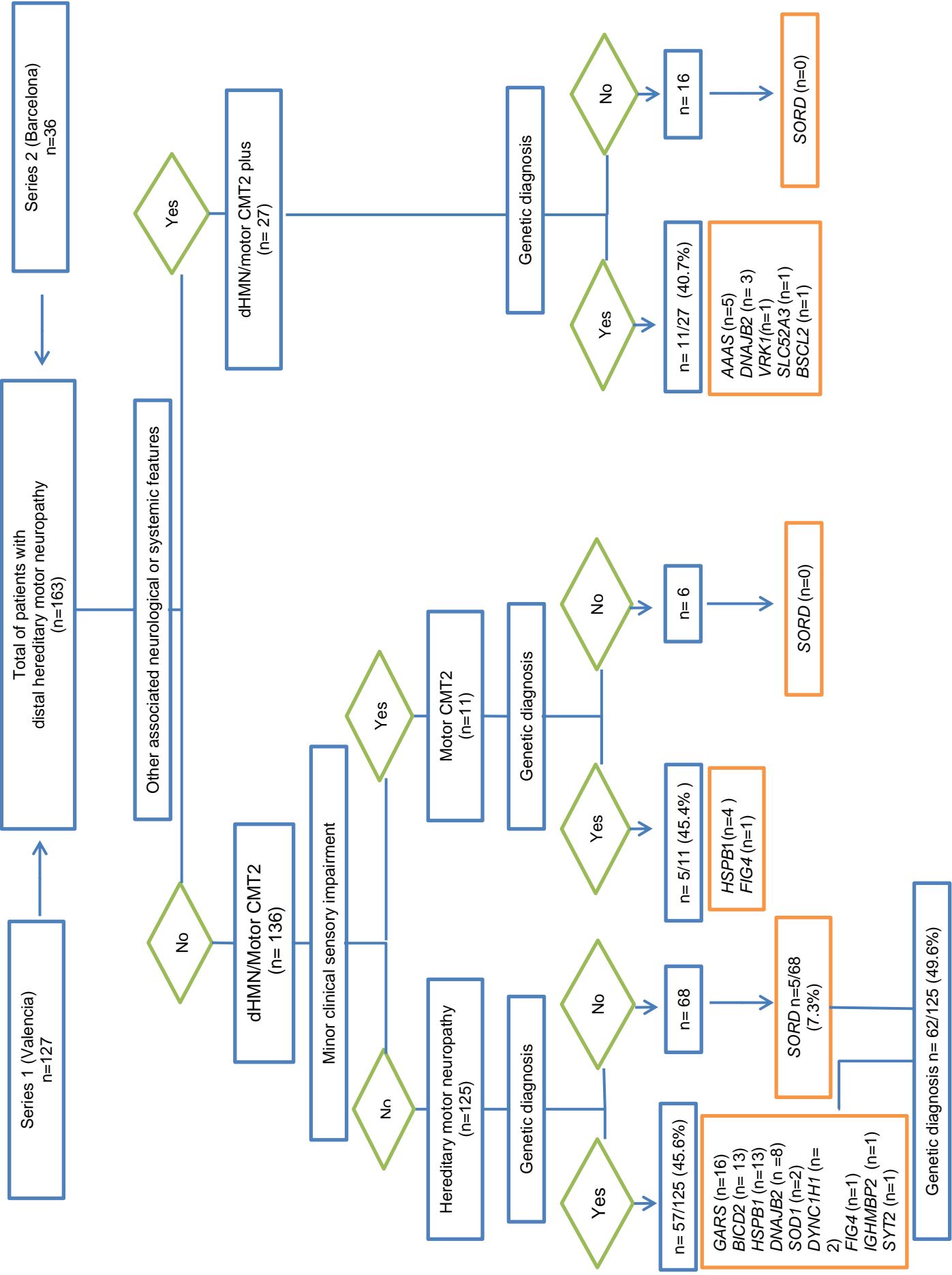


Figure 2. Distribution of the patients according to age of disease onset and the causative mutation

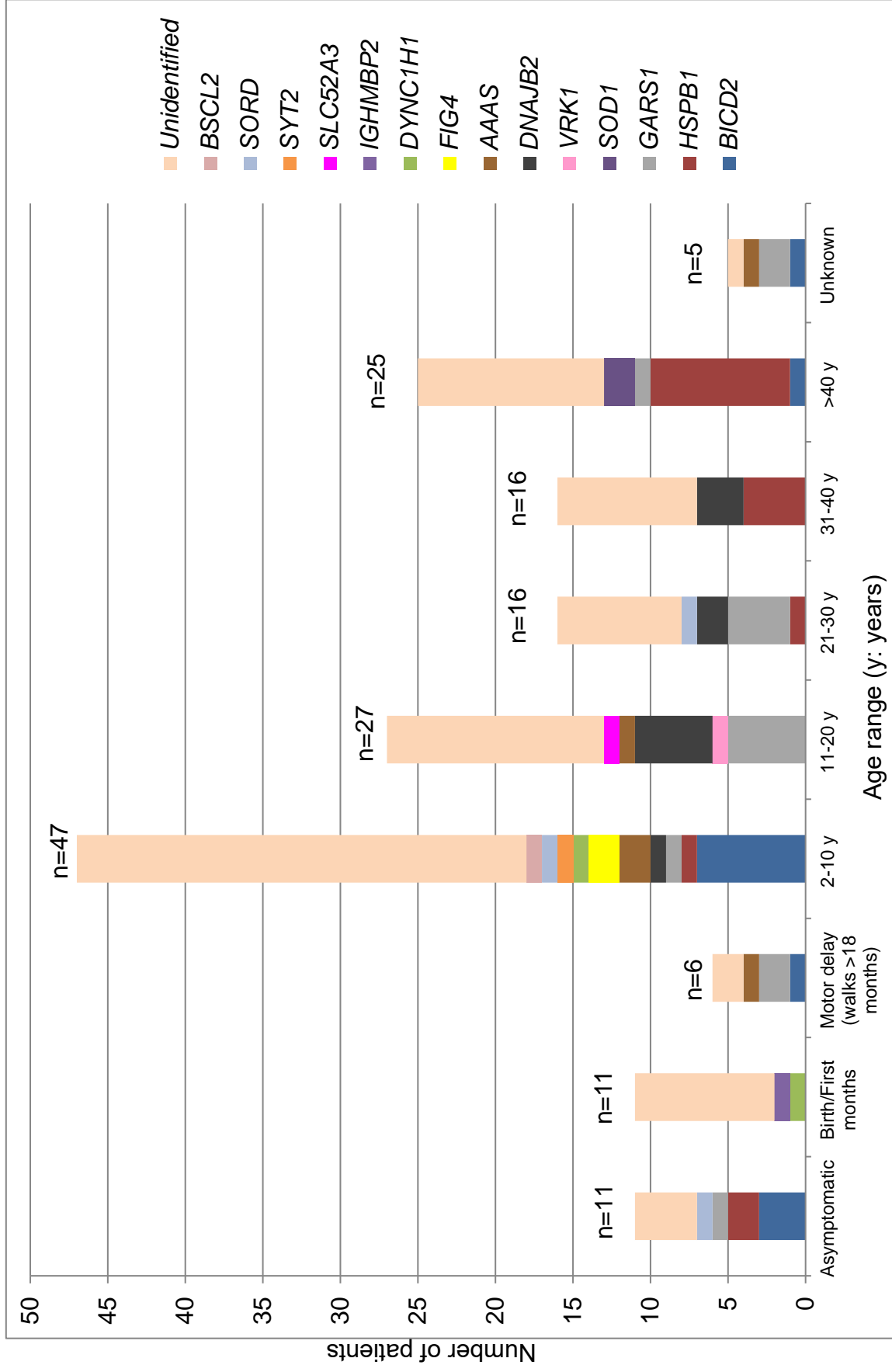
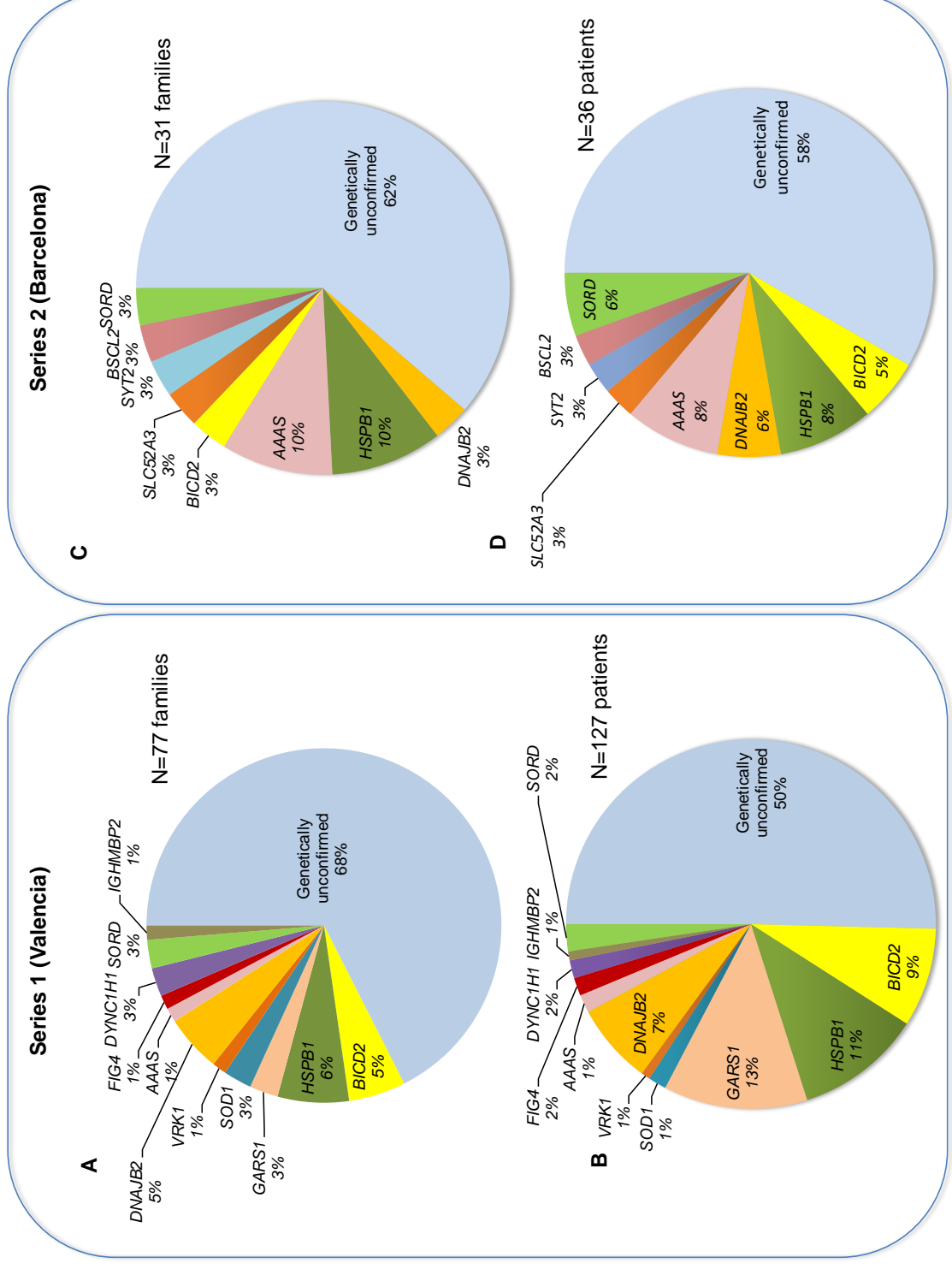




Figure 3. Genetic distribution in series 1 (A and B) and series 2 (C and D)



**Supplementary table 1.** List of the genes included in the CMT/HMN custom gene panels used in Valencia and Barcelona

<b>Valencia</b>
<b>CMT/HMN genes (subgroup_1)</b>
AARS1,AIFM1,AIMP1,ALS2,ANG,ARHGEF10,ASAH1,ATP7A,BICD2,BSCL2,C12ORF65,CHCHD10,CHMP2B,COX6A1,DAO,DCAF8,DCTN1,DCTN2,DGAT2,DHTKD1,DNAJB2,DNM2,DNMT1,DRP2,DYNC1H1,EGR2,ERBB4,FBLN5,FBXO38,FGD4,FIG4,FUS,GAN,GARS1,GDAP1,GJB1,GJB3,GLE1,GNB4,HADHB,HARS1,HINT1,HNRNPA1,HSPB1,HSPB3,HSPB8,IFRD1,IGHMBP2,INF2,KARS1,KIF1B,KIF5A,KLHL9,LITAF,LMNA,LRSAM1,MARS,MATR3,MED25,MFN2,MME,MORC2,MPZ,MTMR2,NAGLU,NDRG1,NEFH,NEFL,NEK1,OPTN,PDK3,PFN1,PLEKHG5,PMP2,PMP22,PNKP,PRPH,PRPS1,PRX,RAB7A,REEP1,SBF1,SBF2,SETX,SH3TC2,SIGMAR1,SLC12A6,SLC25A46,SLC5A7,SOD1,SPG11,SPTLC1,SPTLC2,SPTLC3,SQSTM1,SS18L1,SURF1,TAF15,TARDBP,TBK1,TFG,TRIM2,TRPV4,TUBA4A,TUBB3,UBA1,UBQLN2,VAPB,VCP,VRK1,YARS
<b>CMT/HMN genes (subgroup_2)</b>
AARS1,AIFM1,AIMP1,ALS2,ANG,ARHGEF10,ASAH1,ATP7A,BICD2,BSCL2,C12ORF65,CCNF,CHCHD10,CHMP2B,COX6A1,DAO,DCAF8,DCTN1,DCTN2,DGAT2,DHTKD1,DNAJB2,DNM2,DNMT1,DRP2,DYNC1H1,EGR2,ERBB4,FBLN5,FBXO38,FGD4,FIG4,FUS,GAN,GARS1,GDAP1,GJB1,GJB3,GLE1,GNB4,HADHB,HARS1,HINT1,HNRNPA1,HNRNPA2B1,HSPB1,HSPB3,HSPB8,IFRD1,IGHMBP2,INF2,KARS1,KIF1A,KIF1B,KIF5A,KLHL9,LAS1L,LITAF,LMNA,LRSAM1,MARS,MATR3,MED25,MFN2,MME,MORC2,MPZ,MTMR2,MYH14,NAGLU,NDRG1,NEFH,NEFL,NEK1,OPTN,PARK7,PDK3,PFN1,PLEKHG5,PMP2,PMP22,PNKP,PRPH,PRPS1,PRX,RAB7A,REEP1,SBF1,SBF2,SETX,SH3TC2,SIGMAR1,SLC12A6,SLC25A46,SLC5A7,SOD1,SPG11,SPTLC1,SPTLC2,SPTLC3,SQSTM1,SS18L1,SURF1,TAF15,TARDBP,TBK1,TFG,TRIM2,TRPV4,TUBA4A,TUBB3,UBA1,UBQLN2,VAPB,VCP,VRK1,YARS
<b>CMT/HMN genes (subgroup_3)</b>
AARS1,AIFM1,AIMP1,ALS2,ANG,ARHGEF10,ASAH1,ATP1A1,ATP7A,BAG3,BICD2,BSCL2,C12ORF65,CCNF,CHCHD10,CHMP2B,COX6A1,DAO,DCAF8,DCTN1,DCTN2,DGAT2,DHTKD1,DNAJB2,DNM2,DNMT1,DRP2,DYNC1H1,EGR2,ERBB4,FBLN5,FBXO38,FGD4,FIG4,FUS,GAN,GARS1,GDAP1,GJB1,GJB3,GLE1,GNB4,HADHB,HARS1,HINT1,HNRNPA1,HNRNPA2B1,HSPB1,HSPB3,HSPB8,IFRD1,IGHMBP2,INF2,KARS1,KIF1A,KIF1B,KIF5A,KLHL9,LAS1L,LITAF,LMNA,LRSAM1,MARS,MATR3,MCM3AP,MED25,MFN2,MME,MORC2,MPZ,MTMR2,MYH14,NAGLU,NDRG1,NEFH,NEFL,NEK1,OPTN,PARK7,PDK3,PFN1,PLEKHG5,PMP2,PMP22,PNKP,PRPH,PRPS1,PRX,RAB7A,REEP1,SBF1,SBF2,SETX,SH3TC2,SIGMAR1,SLC12A6,SLC25A46,SLC5A7,SOD1,SPG11,SPTLC1,SPTLC2,SPTLC3,SQSTM1,SS18L1,SURF1,SYT2,TAF15,TARDBP,TBK1,TFG,TRIM2,TRPV4,TUBA4A,TUBB3,UBA1,UBQLN2,VAPB,VCP,VRK1,YARS
<b>Barcelona</b>
<b>CMT/HMN genes</b>
AAAS,AARS1,AGRN,AIFM1,AIMP1,ALS2,ANG,AR,ARHGEF10,ARHGEF28,ASAH1,ASCC1,ATL1,ATM,ATP7A,ATXN3,BICD2,BSCL2,C12orf65,C19orf12,CAVIN1,CCNF,CCT5,CHCHD10,CHMP2B,CHRN1,CHRN2,COX6A1,CTDP1,CU

L4B,DAO,DCAF8,DCTN1,DCTN2,DGAT2,DHTKD1,DNAJB2,DNAJC6,DNM2,D  
NMT1,DRP2,DST,DYNC1H1,EGR2,ELP1,ERBB3,ERBB4,EXOSC3,EXOSC8,F  
BLN5,FBXO38,FGD4,FIG4,FKTN,FUS,GAN,GARS1,GBE1,GDAP1,GJB1,GJB  
3,GLE1,GNB4,HADHB,HARS1,HEXA,HINT1,HK1,HNRNPA1,HNRNPA2B1,HS  
PB1,HSPB3,HSPB8,IFRD1,IGHMBP2,INF2,KARS1,KIF1A,KIF1B,KIF5A,KLHL  
9,LAMB2,LAS1L,LITAF,LMNA,LRSAM1,LYST,MAPT,MARS,MATR3,MED25,M  
FN2,MME,MORC2,MPZ,MTMR2,MUSK,MYH14,MYH3,NAGLU,NDRG1,NEFH,  
NEFL,NEK1,NGF,NTRK1,OPTN,PARK7,PDK3,PFN1,PIP5K1C,PLEC,PLEKHG  
5,PMP2,PMP22,PNKP,POMGNT1,POMT1,POMT2,PRPH,PRPS1,PRX,PSMB8  
,RAB7A,RARS2,RBM28,REEP1,RETREG1,SBF1,SBF2,SCN4A,SCO2,SCP2,S  
ETX,SH3TC2,SIGMAR1,SLC12A6,SLC25A46,SLC52A2,SLC52A3,SLC5A7,SO  
D1,SPG11,SPTLC1,SPTLC2,SPTLC3,SQSTM1,SS18L1,SURF1,SYNE1,TAF1  
5,TARDBP,TBCD,TBCE,TBCK,TBK1,TFG,TNNI2,TNNT3,TRIM2,TRIP4,TRPV4  
,TSEN54,TUBA4A,TUBB3,UBA1,UBQLN2,VAPB,VCP,VRK1,WARS,WNK1,YA  
RS.

**Supplementary table 2.** Clinical and genetic data from the patients with a definitive molecular genetic diagnosis.

<b>SERIES 1. VALENCIA (N=63)</b>					
	<b>Sex</b>	<b>Phenotype</b>	<b>AOO</b>	<b>ALE</b>	<b>Functional status (at last evaluation). Other features</b>
Family 1. <i>B/C/D2</i> . NM_001003800.1:c.320C>T (p.Ser107Leu). Reference: (Peeters et al., 2013). Presentation/Inheritance: AD.					
F1/VLC1	F	SMALED	2-10	48	Proximal and distal weakness in LL. Uses two crutches. Club feet. Shoulder girdle atrophy. Scoliosis. Lumbar hyperlordosis.
F1/VLC2	F	SMALED	2-10	15	Proximal and distal weakness in LL. Difficulty in running and climbing stairs. Foot deformity.
F1/VLC3	M	SMALED	2-10	12	Proximal and distal weakness in LL. Waddling gait. Difficulty in climbing stairs. Foot deformity.
F1/VLC4	M	SMALED	Asy.	9	Mild proximal and distal weakness in LL. Difficulty rising from floor and unable to walk on heels.
Family 2. <i>B/C/D2</i> . NM_001003800.1:c.1454T>G (p.Val485Gly). Reference: (Frasquet et al., 2020). Presentation/Inheritance: AD.					
F2/VLC5	F	SMALED	M.d.	25	Mild proximal and distal weakness in LL. Tripping, falls. Equivocal plantar responses. Foot deformity.
F2/VLC6	M	SMALED	Asy.	59	Mild proximal weakness in LL. Foot deformity.
Family 3. <i>B/C/D2</i> . NM_001003800.1:c.1669T>C (p.Tyr557His). Reference: (Frasquet et al., 2020). Presentation/Inheritance: AD.					
F3/VLC7	F	dHMN/SMALED	Asy.	55	Brisk reflexes in LL. Foot deformity.
F3/VLC8	F	dHMN/SMALED	2-10	28	Mild weakness in distal LL. Mild functional impairment derived from foot deformity. Foot surgery.
F3/VLC9	M	dHMN/SMALED	11-20	22	Difficulty practicing sports. Foot deformity and scapular winging.
Family 4. <i>B/C/D2</i> . NM_001003800.1:c.2042C>T (p.Ser681Leu). Reference: (Bacquet et al., 2018). Presentation/Inheritance: AD.					
F4/VLC10	M	SMALED → motor CMT2	>40	56	Proximal and distal weakness. Difficulty in climbing stairs, steppage gait. Lumbar hyperlordosis. Scoliosis. Sensory impairment on examination.
F4/VLC11	M	SMALED	n.a	n.a	n.a. Deceased.
Family 5. <i>GARS1</i> . NM_002047.3:c.794C>T (p. Ser265Phe). Reference: (Lee et al., 2012). Presentation/Inheritance: AD.					
F5/VLC12	F	dHMN-V	21-30	60	Severe weakness in hands, mild weakness in distal LL.
F5/VLC13	M	dHMN-V	21-30	45	Severe weakness in intrinsic muscles of hands, AFOs.
F5/VLC14	M	dHMN-V	11-20	55	Severe weakness in hands and distal LL. Deceased.
F5/VLC15	F	dHMN-V	21-30	26	Severe weakness in hands and distal LL.
F5/VLC16	F	dHMN-V	>40	77	Mild weakness in hands.
F5/VLC17	F	dHMN-V	11-20	59	Moderate weakness in hands. Mild difficulty walking.
F5/VLC18	F	dHMN	2-10	53	Severe weakness in hands and distal LL. Uses one a cane since the age of 50 years. Foot deformity. Scoliosis.
F5/VLC19	F	dHMN	2-10	26	Mild distal weakness in hands and distal LL. Pes cavus.
F5/VLC20	M	dHMN	21-30	32	Mild distal weakness in LL. Pes cavus.
F5/VLC21	M	dHMN-V *	M.d.	47	Severe weakness in hands and distal LL. Pes cavus.
F5/VLC22	M	dHMN-V	Asy.	27	Mild weakness in hands and distal LL.

Family 6. GARS1. NM_002047.3:c.794C>T (p. Ser265Phe). Reference: (Lee <i>et al.</i> , 2012) Presentation/Inheritance: AD					
F6/VLC23	M	dHMN-V	11-20	18	Severe weakness in intrinsic muscles of hands and mild weakness in distal LL. Pes cavus.
F6/VLC24	M	dHMN-V*	11-20	58	Moderate weakness in hands. Severe weakness in distal LL. Pes cavus. Foot surgery.
F6/VLC25	F	dHMN-V	11-20	31	Moderate weakness in distal UL and LL.
F6/VLC26	F	dHMN-V*	n.a	62	Mild weakness in distal UL and distal LL. Difficulty in fine motor skills. Pes cavus. Foot surgery.
F6/VLC27	F	dHMN-V*	n.a	n.a	n.a. Deceased.
Family 7. HSPB1. NM_001540.4:c.418C>G (p.Arg140Gly). Reference: (Houlden <i>et al.</i> , 2008). Presentation/Inheritance: AD					
F7/VLC28	M	dHMN	31-40	41	Mild weakness in distal LL.
F7/VLC29	M	motor CMT2	>40	72	Severe weakness in distal LL. Mild weakness in hands. Uses a cane for long distances. Minor sensory findings on examination.
F7/VLC30	M	motor CMT2	2-10	40	Severe weakness in distal LL. Uses AFOs. Minor sensory findings on examination.
Family 8. HSPB1. NM_001540.4:c.418C>G (p.Arg140Gly). Reference: (Houlden <i>et al.</i> , 2008). Presentation/Inheritance: AD					
F8/VLC31	M	dHMN	31-40	75	Severe weakness in distal LL and atrophy of intrinsic muscles of hands. Used a cane. Deceased.
F8/VLC32	M	dHMN/motor CMT2	31-40	67	Severe weakness in distal LL and mild in hands. Used AFOs in the seventh decade of life. Pes cavus. Deceased.
F8/VLC33	M	dHMN/ motor CMT2	>40	83	Mild weakness in distal UL. Severe weakness in distal LL. Used a tricycle. Pes cavus. Minor sensory loss on examination. Deceased.
Family 9. HSPB1. NM_001540.4:c.418C>G (p.Arg140Gly). Reference: (Houlden <i>et al.</i> , 2008). Presentation/Inheritance: AD					
F9/VLC34	M	dHMN	>40	65	Severe weakness in distal LL.
Family 10. HSPB1. NM_001540.4:c.418C>G (p.Arg140Gly). Reference: (Houlden <i>et al.</i> , 2008). Presentation/Inheritance: AD					
F10/VLC35	M	dHMN	>40	53	Mild-moderate weakness in distal LL. Steppage gait. Cramps. Minor sensory findings on examination.
F11/VLC36	M	dHMN → motor CMT2	21-30	59	Moderate weakness in hands. Severe weakness in distal LL and mild weakness in proximal LL. Uses walker/wheelchair. Sensory impairment appeared after years of clinical evolution.
Family 11. HSPB1. NM_001540.4:c.418C>G (p.Arg140Gly). Reference: (Houlden <i>et al.</i> , 2008). Presentation/Inheritance: AD					
F11/VLC37	M	dHMN → motor CMT2	>40	67	Severe weakness in distal LL. Mild weakness in hands and proximal LL. Uses walker. Sensory impairment on examination.
F11/VLC38	F	dHMN	>40	54	Moderate-severe weakness in distal LL. Mild weakness in hands. Minor sensory impairment in distal LL.
F11/VLC39	M	dHMN*	31-40	40	Weakness in toes. Cramps, no other symptoms.
F11/VLC40	M	dHMN	Asy.	25	Mild weakness in toes. Difficulty walking on heels. Flat feet.
F11/VLC41	F	Normal	Asy.	23	Normal clinical and electrophysiological examinations.
Family 12. SOD1. NM_000454.4:c.65A>G (p.Glu22Gly). Reference: (Syriani <i>et al.</i> , 2009). Presentation/Inheritance: AD					
F12/VLC42	M	dHMN	>40	46	Severe weakness in hands and distal LL. Pes cavus.
Family 13. SOD1. NM_000454.4:c.65A>G (p.Glu22Gly). Reference: (Syriani <i>et al.</i> , 2009). Presentation/Inheritance: AD					

F13/VLC43	M	Severe dHMN	>40	83	Moderate weakness in hands, severe weakness in distal LL. Mild weakness in proximal LL appeared 18 years after disease onset. No UMN signs. Used wheelchair last year of life. Amyloid angopathy and Alzheimer dementia. Deceased.
Family 14. VRK1. NM_003384.2:c.599T>C (p.Leu200Pro) + c.1160G>A (p.Arg387His).					Reference: this work +(Liu et al., 2020). Presentation/Inheritance: Sporadic/AR
F14/VLC44	F	dHMN with pyramidal tract signs	11-20	48	Severe weakness in distal LL with mild weakness in proximal LL and in distal UL. Uses a cane and AFOs. Hyperreflexia. Extensor left plantar response.
Family 15. DNAJB2/HSJ1. NM_001039550.1:c.352+1G>A in homozygosis.					Reference: (Blumen et al., 2012). Presentation/Inheritance AR
F15/VLC45	F	Progressive dHMN → CMT2	21-30	44	Mild weakness in distal UL. Severe weakness in proximal and distal LL. Uses two crutches. Sensory impairment in distal LL that appeared 10 years after disease onset.
F15/VLC46	M	HMN plus: progressive dHMN/motor CMT2+ parkinsonism	11-20	54	Severe tetraparesis. Uses wheelchair since the age of 40 years. Sensory impairment. Young onset Parkinson disease. Respiratory insufficiency.
Family 16. DNAJB2/HSJ1. NM_001039550.1:c.352+1G>A in homozygosis.					Reference: (Blumen et al., 2012). Presentation/Inheritance AR
F16/VLC47	M	Progressive dHMN/motor CMT2	31-40	74	Severe tetraparesis, used a wheelchair. Sensory involvement that worsened as diseases progressed. Bulbar involvement. Respiratory insufficiency. PEG. Alzheimer disease. Deceased at 76 years of age.
F16/VLC48	M	Progressive dHMN/motor CMT2	21-30	60	Severe tetraparesis. Sensory involvement appeared after years of disease evolution. Bulbar involvement. Respiratory insufficiency. PEG. Deceased at 61 years of age.
Family 17. DNAJB2/HSJ1. NM_001039550.1:c.352+1G>A in homozygosis.					Reference: (Blumen et al., 2012). Presentation/Inheritance AR
F17/VLC49	M	Progressive dHMN/motor CMT2	11-20	63	Severe tetraparesis. Used wheelchair since 48 years of age. Bulbar involvement. Respiratory insufficiency. PEG. Sensory impairment in later stages of the disease. Deceased at 69 years of age.
Family 18. DNAJB2/HSJ1. NM_001039550.1:c.352+1G>A in homozygosis.					Reference: (Blumen et al., 2012). Presentation/Inheritance AR
F18/VLC50	M	dHMN → motor CMT2	11-20	39	Mild weakness in distal UL. Severe weakness in proximal and distal LL. Steppage and waddling gait. Sensory impairment on examination.
F18/VLC51	M	dHMN → motor CMT2	2-10	33	Severe weakness in distal UL. Severe weakness in proximal and distal LL. Uses crutches- wheelchair. Sensory impairment on examination and electrophysiological studies (previously only motor impairment). Prolonged central motor conduction time in magnetic transcranial stimulation.
F18/VLC52	M	dHMN	11-20	26	Moderate weakness in distal LL. Minor sensory findings on examination in last assessments. Pes cavus.
F18/VLC53	F	dHMN	11-20	31	Mild-moderate weakness in proximal LL. Severe weakness in distal LL. Mild weakness in hands.
Family 19. AAAS. NM_015665.5:c.43C>A (p.Gln15*) in homozygosis.					Reference: (Mukhopadhyaya et al., 2006). Presentation/Inheritance AR.
F19/VLC54	F	dHMN plus: triple A syndrome	n.a	57	Mild-moderate weakness in distal UL and LL. Acalasia, bulbar impairment, pyramidal tract signs (spasticity, brisk reflexes), mild sensory impairment on examination, recurrent keratoconjunctivitis.
F19/VLC55	M	dHMN plus: triple A syndrome	11-20	60	Mild weakness in distal UL. Acalasia, bulbar impairment, pyramidal tract signs (spasticity, brisk reflexes), mild sensory impairment on examination, autonomic dysfunction and asymptomatic suprarenal insufficiency.
Family 20. FIG4. NM_014845.5:c.122T>C (p.Ile41Thr) + c.446+5G>C.					Reference: (Chow et al., 2007) + this work. Presentation/Inheritance AR.
F20/VLC56	F	Motor CMT2*	2-10	19	Mild weakness in distal UL and distal LL. Difficulty running. Sensory impairment on examination
F20/VLC57	F	dHMN	2-10	15	Mild weakness in hands. Mild-moderate weakness in foot dorsiflexion and intrinsic muscles of feet. Difficulty running and

					walking on heels.
Family 21. <i>DYNC1H1</i> . NM_001376.4:c.917A>G (p.His306Arg). Reference: (Weedon <i>et al.</i> , 2011). Presentation/Inheritance: sporadic/ <i>de novo</i> .					
F21/VLC58	F	SMALED	Birth/ FM	17	Mild weakness in proximal LL and in toes. Foot deformity.
Family 22. <i>DYNC1H1</i> . NM_001376.4:c.3527T>C (p.Leu1176Ser). Reference: this work. Presentation/Inheritance: sporadic/ <i>de novo</i> .					
F22/VLC59	M	SMALED	2-10	38	Isolated mild weakness in gluteus medius and knee extension. Unable to walk on heels, difficulty running and climbing stairs. Great feet deformity.
Family 23. <i>IGHMBP2</i> . NM_002180.2:c.1488C>A (p.Cys496*) + c.1043T>C (p.Val348Ala). Reference: (Grohmann <i>et al.</i> , 1999) + this work. Presentation/Inheritance: sporadic/A.R					
F23/VLC60	M	Severe HMN → motor CMT	Birth/ FM	27	Severe tetraparesis (no movement in LL). Respiratory insufficiency. Sensory impairment on examination in last assessments (not previously present).
Family 29. <i>SORD</i> . NM_003104.6:c.757delG (p.Ala253GlnfsTer27) + c.458C>A (p.Ala132Asp). Reference: (Cortese <i>et al.</i> , 2020b). Presentation/Inheritance: A.R/A.R					
F29/VLC66	F	Classical dHMN	2-10	55	Severe weakness in distal LL. Mild weakness in proximal LL. Very mild sensory findings on last examinations (not previously present).
F29/VLC128	F	Asymptomatic.	Asy.	43	Pes cavus. Atrophy of intrinsic foot muscles. Difficulty walking on heels.
Family 34. <i>SORD</i> . NM_003104.6:c.757delG (p.Ala253GlnfsTer27) in homozygosis. Reference: (Cortese <i>et al.</i> , 2020b). Presentation/Inheritance: Sporadic/A.R					
F34/VLC71	F	Classical dHMN with later sensory involvement	21-30	53	Severe weakness in distal LL. Mild weakness in proximal LL and distal UL. Sensory findings on lasts examinations (not previously present).
<b>SERIES 2. BARCELONA (N=15)</b>					
	<b>Sex</b>	<b>Phenotype</b>	<b>AOO</b>	<b>ALE</b>	<b>Functional status (at last evaluation) Other features</b>
Family 79. <i>DNAJB2/HSJ1</i> . NM_001039550.1:c.125C>A (p.Ala42Asp) in homozygosis. Reference: this work. Presentation/Inheritance AR.					
F79/BCN1	F	Progressive dHMN/motor CMT with pyramidal tract signs	31-40	47	Walks independently.
F79/BCN2	F	HMN-plus: Progressive dHMN/motor CMT2 with pyramidal tract signs Young-onset parkinsonism	31-40	52	Severe disability due to parkinsonism
Family 80. <i>HSPB1</i> . NM_001540.4:c.418C>G (p.Arg140Gly). Reference: (Houlden <i>et al.</i> , 2008). Presentation/Inheritance: AD.					
F80/BCN3	F	dHMN	>40	n.a	n.a
Family 81. <i>HSPB1</i> . NM_001540.4:c.407G>C (p.Arg136His) Reference: this work. Presentation/inheritance: sporadic/AD.					
F81/BCN4	M	dHMN	>40	76	Walks with support. Uses AFOS in both feet.
Family 82. <i>HSPB1</i> . NM_001540.4:c.418C>G (p.Arg140Gly). Reference: (Houlden <i>et al.</i> , 2008). Presentation/Inheritance: AD.					
F82/BCN5	M	dHMN	>40	58	Distal weakness in LL. Walks independently

Family 83. AAAS. NM_015665.5:c.1331+1G>A (Splice donor) in homozygosis. Reference: (Tullio-Pelet <i>et al.</i> , 2000). Presentation/Inheritance A.R.				
F83/BCN6	F	dHMN plus: triple A syndrome	2-10	18 Walks independently. Alacrima, achalasia, short stature, adrenal insufficiency, Sensory involvement in electrophysiological studies
Family 84. AAAS. NM_015665.5:c.1058T>C (Ile353Thr) in homozygosis. Reference: this work. Presentation/Inheritance AR.				
F84/BCN7	F	dHMN plus: triple A syndrome	M.d	44 HMN with alacrima, achalasia, short stature, adrenal insufficiency and scoliosis. Uses a wheelchair. Sensory involvement in electrophysiological studies
Family 85. AAAS. NM_015665.5:c.211del (His71Ilefs*23) in homozygosis. Reference: (Houlden <i>et al.</i> , 2002). Presentation/Inheritance A.R.				
F85/BCN8	F	dHMN plus: triple A syndrome	2-10	35 HMN with alacrima, achalasia and short stature. Walks independently.
Family 86. BICD2. NM_001003800.1 : c.2108C>T (p. Thr703Met). Reference: (Neveling <i>et al.</i> , 2013). Presentation/Inheritance: AD.				
F86/BCN9	M	dHMN	2-10	69 Uses two crutches.
F86/BCN10	M	dHMN	2-10	37 Uses two crutches.
Family 87. SLC52A3. NM_033409.3:c.394C>T (p.Arg132Trp) in homozygosis. Reference: (Green <i>et al.</i> , 2010). Presentation/Inheritance AR.				
F87/BCN11	F	HMN plus: BVVL	17	19 HMN with deafness and bulbar palsy. Sensory involvement in electrophysiological studies. Walks independently
Family 88. SYT2. NM_177402.4:c.1082_1096del (p.Asp361_Leu365del). Reference: this work. Presentation/Inheritance: sporadic/de novo.				
F88/BCN12	M	dHMN	2-10	30 Pes cavus, distal LL atrophy. Walks independently. Sensory involvement and presynaptic NMJ dysfunction in electrophysiological studies.
Family 89. BSCL2. NM_032667.6:c.269C>T (p.Ser90Leu). Reference: (Windpassinger <i>et al.</i> , 2004). Presentation/Inheritance: AD.				
F89/BCN13	F	dHMN-Motor CMT2 with predominantly UL involvement and pyramidal tract signs	2-10	49 Walks independently
Family 98. SORD. NM_003104.6: c.757delG (p.Ala253GlnfsTer27) + c.458C>A (p.Ala132Asp). Reference: (Cortese <i>et al.</i> , 2020b). Presentation/Inheritance: A.R/A.R				
F98/BCN22	F	dHMN with brisk reflexes	11-20	43 Distal weakness in LL. Pes cavus and brisk reflexes. Walks independently.
F98/BCN23	F	dHMN with brisk reflexes	11-20	49 Distal weakness in LL. Pes cavus and brisk reflexes. Walks independently

AOO: age of onset (in years); ALE: age at last evaluation (in years); AD: autosomal dominant; SMALED: Spinal muscular atrophy lower extremity dominant; LL: lower limbs; Asy: asymptomatic; M.d.: motor delay (walks > 18 months); dHMN: distal hereditary motor neuropathy; Motor CMT2: motor Charcot- Marie-Tooth type 2 (patients who present minor clinical and/or electrophysiological sensory involvement); n.a: not available; dHMN-V: distal hereditary motor neuropathy with predominant involvement of hand muscles; AFOs: ankle foot orthotics ; UL: upper limbs; ; AR: autosomal recessive; FM: first months.; BVVL: Brown-Vialetto-Van-Laere syndrome.

\* Electrophysiological studies not performed.



**References:**

- Bacquet J, Stojkovic T, Boyer A, Martini N, Audic F, Chabrol B, et al. Molecular diagnosis of inherited peripheral neuropathies by targeted next-generation sequencing: Molecular spectrum delineation. *BMJ Open* 2018; 8: e021632.
- Blumen SC, Astord S, Robin V, Vignaud L, Toumi N, Cieslik A, et al. A rare recessive distal hereditary motor neuropathy with HSJ1 chaperone mutation. *Ann. Neurol.* 2012; 71: 509–519.
- Chow CY, Zhang Y, Dowling JJ, Jin N, Adamska M, Shiga K, et al. Mutation of FIG4 causes neurodegeneration in the pale tremor mouse and patients with CMT4J. *Nature* 2007; 448: 68–72.
- Cortese A, Zhu Y, Rebelo AP, Negri S, Courel S, Abreu L, et al. Biallelic mutations in SORD cause a common and potentially treatable hereditary neuropathy with implications for diabetes. *Nat. Genet.* 2020; 52: 473–481.
- Frasquet M, Camacho A, Vilchez R, Argente-Escrig H, Millet E, Vázquez-Costa JF, et al. Clinical spectrum of BICD2 mutations. *Eur. J. Neurol.* 2020
- Green P, Wiseman M, Crow YJ, Houlden H, Riphagen S, Lin JP, et al. Brown-Vialetto-Van Laere Syndrome, a Ponto-Bulbar Palsy with Deafness, Is Caused by Mutations in C20orf54 [Internet]. *Am. J. Hum. Genet.* 2010; 86: 485–489. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.02.006>
- Grohmann K, Wienker T, Saar K, Rudnik-Schöneborn S, Stoltenburg-Didinger G, Rossi R, et al. Diaphragmatic spinal muscular atrophy with respiratory distress is heterogeneous, and one form is linked to chromosome 11q13-q21. *Am. J. Hum. Genet.* 1999; 65: 1459–1462.
- Houlden H, Laura M, Wavrant-De Vrièze F, Blake J, Wood N, Reilly MM. Mutations in the HSP27 (HSPB1) gene cause dominant, recessive, and sporadic distal HMN/CMT type 2. *Neurology* 2008; 71: 1660–1668.
- Houlden H, Smith S, Carvalho M De, Blake J, Mathias C, Wood NW, et al. Clinical and genetic characterization of families with triple A (Allgrove) syndrome. *Brain.* 2002; 125: 2681–2690.
- Lee HJ, Park J, Nakhro K, Mo Park J, Hur Y-M, Choi B-O, et al. Two novel mutations of GARS in Korean families with distal hereditary motor neuropathy type V [Internet]. *J. Peripher. Nerv. Syst.* 2012; 17: 418–421. Available from: <http://sift.jcvi.org/>
- Liu X, Duan X, Zhang Y, Sun A, Fan D. Molecular analysis and clinical diversity of distal hereditary motor neuropathy [Internet]. *Eur. J. Neurol.* 2020 Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ene.14260>
- Mukhopadhyaya A, Danda S, Huebner A, Chacko A. Mutations of the AAAS gene in an Indian family with Allgrove's syndrome. *World J. Gastroenterol.* 2006; 12: 4764–4766.
- Neveling K, Martinez-Carrera LA, Hölker I, Heister A, Verrips A, Hosseini-Barakooie SM, et al. Mutations in BICD2, which encodes a golgin and important motor adaptor, cause congenital autosomal-dominant spinal muscular atrophy. *Am. J. Hum. Genet.* 2013; 92: 946–954.
- Peeters K, Litvinenko I, Asselbergh B, Almeida-Souza L, Chamova T, Geuens T, et al. Molecular defects in the motor adaptor BICD2 cause proximal spinal muscular atrophy with autosomal-dominant inheritance. *Am. J. Hum. Genet.* 2013; 92: 955–964.
- Syriani E, Morales M, Gamez J. The p.E22G mutation in the Cu/Zn superoxide-dismutase gene predicts a long survival time. Clinical and genetic characterization of a seven-generation ALS1 Spanish pedigree. *J. Neurol. Sci.* 2009; 285: 46–53.
- Tullio-Pelet A, Salomon R, Hadj-Rabia S, Mugnier C, de Laet M-H, Chaouachi B, et al. Mutant WD-repeat protein in triple-A syndrome [Internet]. *Nat. Genet.* 2000; 26: 332–335. Available from: <https://doi.org/10.1038/81642>
- Weedon MN, Hastings R, Caswell R, Xie W, Paszkiewicz K, Antoniadi T, et al. Exome sequencing identifies a DYNC1H1 mutation in a large pedigree with dominant Axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Am. J. Hum. Genet.* 2011; 89: 308–312.

Windpassinger C, Auer-Grumbach M, Irobi J, Patel H, Petek E, Hörl G, et al. Heterozygous missense mutations in BSC12 are associated with distal hereditary motor neuropathy and Silver syndrome. *Nat. Genet.* 2004; 36: 271–276.

Supplementary table 3. Patients with inconclusive genetic diagnosis and identified VUS

Patient	Sex	Pres./Inh.	Phenotype	AOO	Gene	Nucleotide change (protein prediction)	RefSeq (ID)	Previously gene-associated phenotype and described pattern of inheritance
F24/ VLC61	M	Sporadic	Mild dHMN affecting LL with static course and severe foot deformity.	2-10	<i>DYNC1H1</i>	NM_001376.4:c.11489A>G (p.Gln3830Arg)	This work	SMALED, AD (Scoto <i>et al.</i> , 2015)
F25/ VLC62	M	Sporadic	dHMN + pyramidal tract signs (brisk reflexes and altered central conduction time)	2-10	<i>KIF1B</i>	NM_015074.3:c.4162G>T (p.Asp1388Tyr)	This work	CMT2A, AD (Zhao <i>et al.</i> , 2001) (only one family described. MFN2 mutations localized in the same chromosome 1p36.2 region were later identified as a cause of CMT2A)
F26/ VLC63	M	Sporadic	Asymmetrical lower limb dHMN	2-10	<i>DHTKD1</i>	NM_018706.6:c.2009A>G (p.Asn670Ser)	rs762399216	CMT2, AD (Xu <i>et al.</i> , 2012)
F27/ VLC64	F	Sporadic	dHMN	21-30	<i>BICD2</i>	NM_001003800.1:c.14C>G (p.Ser5Tyr)	This work	SMALED with typical muscle MRI pattern, AD (Rosser <i>et al.</i> , 2015b)
F28/ VLC65	M	Sporadic	SMALED	>40	<i>UBA1</i>  <i>AARS1</i>	NM_003334:c.779A>G (p.Asn260Ser)  NM_001605.2:c.592C>T (p.Arg198Trp)	This work  rs753033177	X-linked severe infantile SMA(Ramser <i>et al.</i> , 2008)  CMT2/dHMN with variable age of onset, AD(Latour <i>et al.</i> , 2010; Zhao <i>et al.</i> , 2012)

F30/ VLC67	F	Sporadic	Mild dHMN with static course	2-10	SIGMAR1	NM_005866.3:c.11C>T; (p.Ala4Val)	rs367968662	Juvenile ALS, AR. (Al-Saif <i>et al.</i> , 2011)  Early onset dHMN with progression during adolescence, AR. (Li <i>et al.</i> , 2015)  CMT2 with optic atrophy, AR. (Abrams <i>et al.</i> , 2015)
F31/ VLC68	M	Sporadic	Mild dHMN	2-10	SLC25A46	NM_138773.2:c.106G>A (p.Gly36Arg)	rs761259380	Congenital lethal pontocerebellar hypoplasia, AR. (Wan <i>et al.</i> , 2016)
F32/ VLC69	F	Sporadic	Classical dHMN with exclusively lower limb involvement	2-10	HINT1	NM_005340.6:c.160G>T (p.Val54Leu)	This work	CMT2/predominantly motor neuropathy with neuromyotonia, AR. (Zimon <i>et al.</i> , 2012)  Infantile SMA with diaphragmatic palsy, AR. (Grohmann <i>et al.</i> , 2001b)
F33/ VLC70	F	Sporadic	Classical slowly progressive dHMN	2-10	IGHMBP2	NM_002180.2:c.2188C>T (p.Arg730Trp)	rs146409569	Early onset CMT2, AR. (Cottenie <i>et al.</i> , 2014)
F35/ VLC72	F	Sporadic	Classical dHMN	2-10	GLE1	NM_001003722.1:c.153G>A (p.Trp51*)	This work	Congenital arthrogryposis with anterior horn cell disease, AR (Nousiainen <i>et al.</i> , 2008)

F90/ BCN14	M	Sporadic	dHMN	11-20	ARHGEF10	NM_014629:c.2602G>A (p.Glu868Gln)	rs1242697736	Neuropathy with slow nerve conduction velocity, AD. (Verhoeven <i>et al.</i> , 2003)
F91/ BCN15	M	Sporadic	Finger extension weakness + Downbeat nystagmus	21-30	ARHGEF10	NM_014629:c.2797-2805del (p.Leu933_Met935del)	This work	Neuropathy with slow nerve conduction studies, AD. (Verhoeven <i>et al.</i> , 2003)
F92/ BCN16	F	Sporadic	Distal HMN with subclinical sensory involvement in electrophysiological studies	>40	DCTN1	NM_004082.4:c.414+1G>A (splice donor)	This work	dHMN with vocal cord involvement, facial weakness, UL>LL weakness, AD. (Puls <i>et al.</i> , 2003)
F93/ BCN17	M	Sporadic	Distal HMN with subclinical sensory involvement in electrophysiological studies	>40	HSPB8	NM_014365.2:c.65G>A (p.Arg22Gln)	rs747381453	dHMN, AD. (Irobi <i>et al.</i> , 2004c) CMT2, AD. (Tang <i>et al.</i> , 2005)
F94/ BCN18	F	Sporadic	Severe dHMN with subclinical sensory involvement in electrophysiological studies	>40	DNM2	NM_001005361.2:c.868C>T (p.Arg290Trp)	rs587778235	Intermediate and axonal CMT, AD. (Züchner <i>et al.</i> , 2005; Claeys <i>et al.</i> , 2009)
F96/ BCN 20	M	Sporadic	Distal HMN with subclinical sensory involvement in electrophysiological studies	>40 y	MME	NM_000902:c.413C>G (p.Ala138Gly)	This work	Late onset CMT2, AR. (Higuchi <i>et al.</i> , 2016)



**References:**

1. Scoto M, Rossor AM, Harms MB, et al. Novel mutations expand the clinical spectrum of DYNC1H1-associated spinal muscular atrophy. *Neurology*. Lippincott Williams and Wilkins; 2015;84:668–679.
2. Zhao C, Takita J, Tanaka Y, et al. Charcot-Marie-Tooth Disease Type 2A Caused by Mutation in a Microtubule Motor KIF1B. *Cell* [online serial]. 2001;105:587–597. Accessed at: <http://www>.
3. Xu WY, Gu MM, Sun LH, et al. A nonsense mutation in DHTKD1 causes charcot-marie-tooth disease type 2 in a large chinese pedigree. *Am J Hum Genet* [online serial]. The American Society of Human Genetics; 2012;91:1088–1094. Accessed at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.09.018>.
4. Rossor AM, Oates EC, Salter HK, et al. Phenotypic and molecular insights into spinal muscular atrophy due to mutations in BICD2. *Brain*. Oxford University Press; 2015;138:293–310.
5. Ramsar J, Ahearn ME, Lenski C, et al. Rare Missense and Synonymous Variants in UBE1 Are Associated with X-Linked Infantile Spinal Muscular Atrophy. *Am J Hum Genet*. 2008;82:188–193.
6. Latour P, Thauvin-Robinet C, Baudelet-Méry C, et al. A Major Determinant for Binding and Aminoacylation of tRNA<sup>Ala</sup> in Cytoplasmic Alanyl-tRNA Synthetase Is Mutated in Dominant Axonal Charcot-Marie-Tooth Disease. *Am J Hum Genet*. Cell Press; 2010;86:77–82.
7. Zhao Z, Hashiguchi A, Hu J, et al. Alanyl-tRNA synthetase mutation in a family with dominant distal hereditary motor neuropathy. *Neurology*. 2012;78:1644–1649.
8. Grohmann K, Schuelke M, Diers A, et al. Mutations in the gene encoding immunoglobulin  $\mu$ -binding protein 2 cause spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1. *Nat Genet* [online serial]. 2001;29:75–77. Accessed at: <https://doi.org/10.1038/ng703>.
9. Cottenie E, Kochanski A, Jordanova A, et al. Truncating and missense mutations in IGHMBP2 cause Charcot-Marie Tooth disease type 2. *Am J Hum Genet*. Cell Press; 2014;95:590–601.
10. Nicolaou P, Cianchetti C, Minaidou A, et al. A novel LRSAM1 mutation is associated with autosomal dominant axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Eur J Hum Genet*. 2013;21:190–194.

11. Guernsey DL, Jiang H, Bedard K, et al. Mutation in the gene encoding ubiquitin ligase LRSAM1 in patients with charcot-marie-tooth disease. *PLoS Genet.* 2010;6.
12. Al-Saif A, Al-Mohanna F, Bohlega S. A mutation in sigma-1 receptor causes juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 2011;70:913–919.
13. Li X, Hu Z, Liu L, et al. A SIGMAR1 splice-site mutation causes distal hereditary motor neuropathy. *Neurology* [online serial]. 2015;84:2430–2437. Accessed at: <http://neuromuscular.wustl.edu/>.
14. Abrams AJ, Hufnagel RB, Rebelo A, et al. Mutations in SLC25A46, encoding a UGO1-like protein, cause an optic atrophy spectrum disorder. *Nat Genet.* *Nature Publishing Group*; 2015;47:926–932.
15. Wan J, Steffen J, Yourshaw M, et al. Loss of function of SLC25A46 causes lethal congenital pontocerebellar hypoplasia. *Brain.* *Oxford University Press*; 2016;139:2877–2890.
16. Zimoń M, Baets J, Almeida-Souza L, et al. Loss-of-function mutations in HINT1 cause axonal neuropathy with neuromyotonia. *Nat Genet.* 2012;44:1080–1083.
17. Montecchiani C, Pedace L, Lo Giudice T, et al. ALS5/SPG11/KIAA1840 mutations cause autosomal recessive axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Brain.* *Oxford University Press*; 2016;139:73–85.
18. Stevanin G, Santorelli FM, Azzedine H, et al. Mutations in SPG11, encoding spatacsin, are a major cause of spastic paraplegia with thin corpus callosum. *Nat Genet.* 2007;39:366–372.
19. Oriacchio A, Babalini C, Borreca A, et al. SPATACSIN mutations cause autosomal recessive juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Brain.* *Oxford University Press*; 2010;133:591–598.
20. Nousiainen HO, Kestilä M, Pakkasjärvi N, et al. Mutations in mRNA export mediator GLE1 result in a fetal motoneuron disease. *Nat Genet.* 2008;40:155–157.
21. Verhoeven K, De Jonghe P, Van De Putte T, et al. Slowed Conduction and Thin Myelination of Peripheral Nerves Associated with Mutant Rho Guanine-Nucleotide Exchange Factor 10. *Am J Hum Genet.* 2003;73:926–932.
22. Puls I, Jonnakuty C, LaMonte BH, et al. Mutant dynactin in motor neuron disease. *Nat Genet.* 2003;33:455–456.
23. Irobi J, Van Impe K, Seeman P, et al. Hot-spot residue in small heat-shock protein 22 causes distal motor neuropathy. *Nat Genet* [online serial]. 2004;36:597–601. Accessed at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ng1328>.



24. Tang BS, Zhao G hua, Luo W, et al. Small heat-shock protein 22 mutated in autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease type 2L. *Hum Genet.* 2005;116:222–224.
25. Züchner S, Nouredine M, Kennerson M, et al. Mutations in the pleckstrin homology domain of dynamin 2 cause dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat Genet [online serial].* 2005;37:289–294. Accessed at: <https://doi.org/10.1038/ng1514>.
26. Claeys KG, Züchner S, Kennerson M, et al. Phenotypic spectrum of dynamin 2 mutations in Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Brain.* Oxford University Press; 2009;132:1741–1752.
27. Higuchi Y, Hashiguchi A, Yuan J, et al. Mutations in MME cause an autosomal-recessive Charcot-Marie-Tooth disease type 2. *Ann Neurol [online serial].* Hoboken: John Wiley and Sons Inc.; 2016;79:659–672. Accessed at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5069600/>.
28. Couthouis J, Hart MP, Shorter J, et al. A yeast functional screen predicts new candidate ALS disease genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* United States; 2011;108:20881–20890.



**Supplementary table 4. List of identified VUS that were reclassified as likely benign (LB) after performing segregation analysis in healthy or affected family members.**

Family/PatientID	Genetic variant
F29/VLC66	<i>LRSAM1</i> (NM_001005373.3:c.1298C>T, p.S433L)
F35/VLC72	<i>HSPB1</i> (NM_001540.4:c.388G>A, p.E130K)
F36/VLC73	<i>GJB3</i> (NM_024009.2:c.652_663delCTGCACAAGGAC, p.L218_D221del)
F41/VLC82	<i>FIG4</i> (NM_014845.5:c.29G>A, p.S10N)
F43/VLC85	<i>SQSTM1</i> (NM_003900.4:c.1313C>T, p.P438L)
F44/VLC86	<i>ERBB4</i> (NM_005235.2:c.587G>A, p.R196H)
F47/VLC89	<i>AARS1</i> (NM_001605.2:c.1792C>T, p.R598*)
F48/VLC90	<i>DAO</i> (NM_001917.4:c.962G>T, p.G321V)
	<i>KIF1A</i> (NM_001244008.1:c.3234C>A, p.S1078R)
F50/VLC92	<i>SLC5A7</i> (NM_021815.4: c.1564A>C, p.S522R)
F55/VLC97	<i>GJB3</i> (NM_024009.2:c.95G>A, p.R32Q)
	<i>NEK1</i> (NM_012224.2:c.3092A>G, p.Q1031R)
F56/VLC98	<i>HSPB1</i> (NM_001540.4:c.109C>T, p.R37W)
F57/VLC99	<i>KARS1</i> (NM_001130089.1:c.824G>A, p.R275H)
	<i>GARS1</i> (NM_002047.3:c.1675A>G, p.K559E)
F58/VLC100	<i>KIF1A</i> (NM_001244008.1:c.1264C>T, p.R422C)
F59/VLC101	<i>KIF1A</i> (NM_001244008.1:c.107C>A, p.T36N)
F60/VLC102	<i>KIF1A</i> (NM_001244008.1:c.791G>A, p.R264H)
F66/VLC108	<i>KIF5A</i> (NM_004984.2:c.2147G>A, p.R716Q)
F68/VLC110	<i>GJB3</i> (NM_024009.2:c.689C>T, p.S230L)
F74/VLC117	<i>KIF1A</i> (NM_001244008.1:c.4918C>A, p.P1640T)
F75/VLC119	<i>MORC2</i> (NM_014941.2:c.526C>T, NP_055756.1:p.R176C)
F78/VLC127	<i>ARHGEF10</i> (NM_014629.2:c.3634C>T, p.P1212S)
	<i>MME</i> (NM_000902.3:c.674G>C, p.G225A)



## Artículo 2

M Frasquet , A Camacho , R Vílchez , H Argente-Escrig , E Millet , J F Vázquez-Costa, R Silla, A Sánchez-Monteagudo , J J Vílchez , C Espinós , V Lupo # , T Sevilla. #.

# Igual contribución

### **Clinical spectrum of BICD2 mutations.**

Eur J Neurol. 2020 Jul;27(7):1327-1335.

doi: 10.1111/ene.14173. Epub 2020 Mar 16.



## THE CLINICAL SPECTRUM OF *BICD2* MUTATIONS

Marina Frasquet<sup>1,2,3</sup>, MD; Ana Camacho-Salas<sup>4</sup>, MD; Roger Vílchez<sup>2</sup>; Herminia Argente-Escrig<sup>1,2,3</sup>, MD; Elvira Millet<sup>5</sup>, MD; Juan F. Vázquez-Costa<sup>1,2,3,6</sup>, MD, PhD; Raquel Silla<sup>7</sup>, MD; Ana Sánchez-Monteagudo<sup>3,9</sup>, PhD; Juan J. Vílchez<sup>1,2,3,6</sup>, MD, PhD; Carmen Espinós<sup>3,8,9,10</sup>, PhD; Vincenzo Lupo<sup>\*3,8,9</sup>, PhD; Teresa Sevilla<sup>\*1,2,3,6,11</sup>, MD, PhD

\* Equal contribution as senior authors

1. Neuromuscular Diseases Unit, Neurology Department, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Valencia, Spain
2. Neuromuscular & Ataxias Research Group, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Valencia, Spain
3. Joint Unit for research on Rare Diseases, CIPF-IISLa Fe, Valencia, Spain
4. Division of Child Neurology, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid; and Faculty of Medicine, Complutense University of Madrid, Spain.
5. Department of Clinical Neurophysiology, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Valencia, Spain
6. Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Spain
7. Neurology Department, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain
8. Unit of Genetics and Genomics of Neuromuscular and Neurodegenerative Disorders
9. Service of Genomics and Translational Genetics, Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF), Valencia, Spain.
10. Department of Genetics, Universitat de València, Valencia, Spain
11. Department of Medicine, Universitat de València, Valencia, Spain

Correspondence to:

Teresa Sevilla

Department of Neurology

Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Avenida Fernando Abril Martorell 106, 46026

Valencia, Spain; [sevilla\\_ter@gva.es](mailto:sevilla_ter@gva.es); Tel.(0034) 630037313. Fax. (0034) 961246241

## **Abstract**

**Background:** Mutations in the *BICD2* gene cause autosomal dominant lower extremity-predominant spinal muscular atrophy 2A (SMALED2A), a condition that is associated with a specific pattern of thigh and calf muscle involvement when studied by Magnetic Resonance Imaging (MRI). Patients may present minor clinical sensory impairment, however objective sensory involvement has yet to be demonstrated.

**Methods:** We collected clinical data from 11 patients from five different families carrying mutations in *BICD2*. Genetic diagnosis was achieved using gene panel testing and skin biopsies were taken from two patients to study the Epidermal Nerve Fiber Density (ENFD).

**Results:** In the studied patients, three new pathogenic mutations were detected as well as the already defined pathogenic p.Ser107Leu mutation. The most frequent clinical picture was characterized by lower limb weakness in combination with foot deformities. One patient manifested clinical and electrophysiological sensory impairment, and the ENFD study of another patient revealed the existence of a small fiber neuropathy. Muscle MRI showed a common pattern of fat deposition including selective involvement of gluteus medius and minimus at the pelvic level, the anterior compartment of the thigh, and the posterior compartment of the calf, with only mild or no involvement of the intrinsic foot muscles.



Conclusions: We report three new pathogenic mutations in the *BICD2* gene. Muscle MRI confirms the existence of a selective pattern of thigh and leg muscle involvement in SMALED2A, providing additional information regarding pelvic and foot muscles. Moreover, our results raise the possibility of sensory involvement in the disease.

**Total word count of the manuscript:** 4547

**Running title:** Clinical and MRI features related to *BICD2* mutations

**Keywords:** BICD2; spinal muscular atrophy; hereditary motor neuropathy; muscle magnetic resonance imaging, Charcot-Marie-Tooth.

**Disclosure of Conflict of Interest statement:** The authors report no disclosures relevant to the manuscript.

## 1. Introduction

Mutations in the Bicaudal D2 Drosophila homologue 2 (*BICD2*) gene have been described as a cause of lower extremity-predominant spinal muscular atrophy 2A (SMALED2A: MIM 615290) (Neveling *et al.*, 2013; Oates *et al.*, 2013; Peeters *et al.*, 2013). *BICD2* is a multifunctional adaptor protein that interacts with motor proteins like the dynein-dynactin complex and kinesin1, thereby influencing the microtubule-mediated transport of cellular cargos (Hoogenraad *et al.*, 2003; Grigoriev *et al.*, 2007; Splinter *et al.*, 2010).

The inheritance of pathogenic mutations in *BICD2* follows an autosomal dominant (AD) pattern and some sporadic cases are due to *de novo* mutations (Bansagi *et al.*, 2015b, Rossor *et al.*, 2015b). Disease onset is typically at birth or childhood, although some adult onset cases have also been described (Synofzik *et al.*, 2014). The phenotype associated with these mutations consist in weakness and atrophy in the proximal and distal muscles of the lower limbs, which are often accompanied by ankle and knee

contractures, as well as other features like congenital hip dysplasia, foot deformities, lumbar hyperlordosis, scapular winging or upper motor neuron signs. The course of the disease is static or slowly progressive and most patients can walk independently (Rossor *et al.*, 2015b). Electrophysiological evaluation shows normal nerve conduction studies (NCS) in most patients, with chronic neurogenic changes (chronic denervation) seen in electromyography (EMG). Magnetic resonance imaging (MRI) studies have identified a specific pattern of muscle involvement, with fat replacement in most thigh muscles except for a sparing of the adductors and semitendinosus muscles (Oates *et al.*, 2013; Synofzik *et al.*, 2014, Bansagi *et al.*, 2015b, Rossor *et al.*, 2015b; Unger *et al.*, 2016). Some patients may manifest minor sensory symptoms, although these are not accompanied by abnormal sensory nerve responses in electrophysiological studies (Rossor *et al.*, 2015b).

Isolated cases that differ from the standard clinical picture have been recently described, namely a patient diagnosed with axonal Charcot-Marie-Tooth (CMT2) (Bacquet *et al.*, 2018) and a case diagnosed with distal myopathy (Souza *et al.*, 2018). Here, we describe 11 Spanish patients with neuromuscular disease associated with four different mutations in *BICD2*. Two of these mutations have not been previously reported in any control or disease-causing mutation databases consulted, and one has been previously described as probably pathogenic in one family. We describe the clinical, electrophysiological and muscle MRI findings from these patients, including images at the pelvic level and of the feet. Our study manifests the clinical variability that patients may present and includes the results of skin biopsies from two patients in which Epidermal Nerve Fiber Density (ENFD) was studied to explore the possible sensory involvement in the disease.

## **2. Patients and Methods**

Eleven patients from five different families were studied, having been diagnosed with spinal muscular atrophy (SMA), dHMN or CMT2 at two tertiary referral centers in

Spain. All of them were subjected to neurological examination and electrophysiological studies using standard techniques (Sivera *et al.*, 2013). A mutation in heterozygosis in *BICD2* was detected in all the affected individuals. Genetic diagnosis was achieved using a gene panel for the study of neuromuscular diseases (Lupo *et al.*, 2018). In all cases, the mutation was confirmed by Sanger sequencing and segregation analysis was performed. *In silico* pathogenicity study was performed using the following algorithms and programs: PROVEAN, SIFT, Polyphen-2, GERP, and PhyloP.

Muscle MRI was performed on all patients, obtaining standard axial sections at different levels of the lower limbs, as described previously (Sivera *et al.*, 2010). Images were obtained at the level of the hip, thigh, lower leg and feet from all patients except F5 II:1, for whom only sections at the level of thigh and lower leg were obtained. Two skin biopsies were taken to study ENFD from two patients in the same family (F2 III:1 and F2 IV:1): one from the distal calf, 10 cm above the lateral malleus; and the other from the thigh, 20 cm below the iliac spine. The biopsies were obtained using local lidocaine anesthesia and under sterile conditions using a disposable 3 mm punch. Sections (50  $\mu$ m thick) were immunostained for the protein gene product-9.5 (PGP 9.5) and the ENFD was calculated by a trained operator following previously described guidelines (Sommer and Lauria, 2007), comparing the data to local laboratory reference values (normal cut-off values: proximal 8 fibers/mm; distal 4.5 fibers/mm).

All the patients and relatives included in the present study provided their informed consent prior to their enrollment and the research protocols were approved by the institutional board of the Ethics Committee of Hospital Universitari i Politècnic La Fe and Hospital Universitario 12 de Octubre.

### 3. Results

Family history was suggestive of AD inheritance in all cases except for family 5, in which the proband was a sporadic case (Fig. 1). Genetic analysis revealed four

different *BICD2* mutations in the five families. In families 1 and 2, two novel heterozygous mutations were identified [c.1669T>C (p.Tyr557His) and c.1454T>G (p.Val485Gly)], respectively. In family 3, the c.2042C>T (p.Ser681Leu) change was detected. This variant has not been reported in any control database consulted, but it was identified elsewhere in a proband with a family history of AD CMT2 (Bacquet *et al.*, 2018), suggesting a pathogenic role for this mutation. The previously described c.320C>T (p.Ser107Leu) mutation was detected in family 4, as well as in the proband from family 5. In all cases the mutations were present in heterozygosis in the affected individuals only, thus co-segregating with the disease. In family 5 neither parent carried the c.320C>T nucleotide change suggesting that the mutation occurred *de novo*. *In silico* studies estimated a potentially damaging effect of all the mutations (supplementary table 1; online only).

The clinical data is summarized in Table 1. The initial clinical diagnosis in family 1 and family 2 was dHMN, while the proband from family 3 was diagnosed with CMT2, and the patients in families 4 and 5 were diagnosed with non-5q SMA. The age of onset was very variable, ranging from birth to 45 years old, and the most frequent phenotype upon initial assessment was mild weakness, predominantly in distal muscles of the lower limbs, combined with foot deformities. In some cases, like F1 IV:1 and F1 IV:2, the main complaint was disability derived from foot deformity. Some patients were asymptomatic (F1 III:2 and F2 III:1), whereas patients in families 4 and 5 had a more severe phenotype and also displayed additional features like congenital hip dysplasia (F4 IV:1) or scapular winging (F4 III:1 and F5 II:1) that was also present in F1 IV:2. Sensory impairment was found on examination in patients F1 III:2, F2 III:1 and F3 III:1, although only the latter referred sensory symptoms that were first noted in his fifth decade of life, some years after the onset of the motor symptoms. This patient was also diagnosed with diabetes mellitus at 52 years of age.

The findings of the electrophysiological studies are summarized in supplementary table 2 (online only). NCS only revealed reduced sensory nerve action potentials (SNAPs) and motor action nerve potentials (CMAPs) in one patient (F3 III:1) that was diagnosed with CMT2. In the rest of the patients the NCS were within the normal range. Chronic denervation was predominantly evident in the lower limbs of all patients, yet there were no signs of acute denervation in any patient. Central motor conduction studies (cortical magnetic motor-evoked potentials in the lower limbs) and somatosensory evoked potentials (SSEP) in the tibial nerve were studied in three patients (F1 III:2, F2 III:1 and F2 IV:1) and were normal.

MRI showed a common pattern of muscle involvement in all patients, although the severity of fatty infiltration varied between each individual. At the pelvic level, MRI revealed fatty replacement predominantly in the gluteus medius and gluteus minimus muscles, witnessed in 5 out of 10 patients (Fig.2). At the thigh level, the most severely affected muscles were the rectus femoris and vastus lateralis. (Fig.3). At the mid-calf level, the medial and lateral gastrocnemius were the most severely affected muscles, although other muscles like the soleus or tibialis anterior muscle were also frequently affected (Fig. 3). MRI at foot level was performed in 10 patients and fatty infiltration was only found in two cases: F2 III:1 and F4 III:1 (Fig. 4).

In the asymptomatic patient F2 III:1, skin biopsy revealed a reduction in ENFD that followed a length-dependent pattern. The ENFD in the proximal biopsy was 6.4 fibers/mm and it was 1.75 fibers/mm in the distal biopsy (Fig. 5). By contrast, the ENFD was within normal values at both the proximal and distal level in her younger affected daughter (F2 IV:1).

#### **4. Discussion**

We present here the clinical picture of 11 patients who carry four different heterozygous mutations in the *BICD2* gene that segregate with the disease. Two of the

mutations (p.Tyr557His and p.Val485Gly) identified independently in two families (family 1 and family 2) are novel and predicted to be clinical mutations. The third variant identified in family 3 (p.Ser681Leu), has previously been described in a patient with a similar phenotype diagnosed with AD CMT2 (Bacquet *et al.*, 2018), and thus we confirm the association of this mutation with the disease. The p.Ser107Leu alteration has already been reported in several patients, and while it segregated in an AD manner in family 4, it arose *de novo* in the proband from family 5. As suggested previously, these results support the notion that p.Ser107Leu represents a “hot spot” mutation (Bansagi *et al.*, 2015b, Rossor *et al.*, 2015b).

The phenotype of our patients is mainly characterized by lower limb weakness in combination with foot deformities. However, it is interesting that in some cases the only complaint was foot deformity, and muscle weakness was minimal or even absent upon clinical examination, although EMG and MRI alterations were always found, even in asymptomatic patients. Previous reports show that some *BICD2* mutation carriers can be asymptomatic until a late age or present only mild symptoms (Synofzik *et al.*, 2014). In our series, probands F1 III:2 and F2 III:1 remained asymptomatic at the age of 50 and 53, respectively. In these cases, diagnosis may be difficult and MRI may be fundamental in this process. The MRI findings in our patients reflected a specific pattern of muscle involvement, similar to the one described in other *BICD2* patients (Oates *et al.*, 2013; Synofzik *et al.*, 2014, Bansagi *et al.*, 2015b, Rossor *et al.*, 2015b; Unger *et al.*, 2016). The only exception for this pattern comes from a patient diagnosed with familiar distal myopathy who carried the c.1864C>T(p.Arg622Trp) mutation in *BICD2* and in whom MRI revealed severe muscle atrophy in the anterior compartment of the legs, with only very mild involvement of the posterior compartment and no changes at the thigh level (Souza *et al.*, 2018). However, segregation studies were not performed and the p.Arg622Trp change is reported four times on gnomAD database, which questions the pathogenic role of this variant.

We also performed studies at the level of pelvis and feet, demonstrating selective involvement of the gluteus medius and gluteus minimus muscles in some patients. Selective fat replacement of the gluteus medius muscle was reported previously in one patient (Bansagi *et al.*, 2015b), although to our knowledge this study is the first to include systematic MRI analysis at this level. Intrinsic muscles of the feet were only implicated in two patients, one of whom was asymptomatic (F2 III:1) while the other (F4 III:1) was one of the most severely affected in our cohort. In both cases, the thigh and pelvic muscles were more affected than those of the feet, which is consistent with the fact that this is not a length-dependent disease.

The clinical variability among individuals from the same family and those from different families is also quite remarkable. In our cohort the most severely affected patients were from families 4 and 5, who carried the same p.Ser107Leu mutation. The patient from family 3 who carried the p.Ser681Leu change had a moderate phenotype, while patients from family 1 with the p.Tyr557His change and from family 2 with the p.Val485Gly change expressed a milder phenotype. Other clinical signs described in association with this condition, such as shoulder girdle atrophy, extensor plantar reflexes, lumbar hyperlordosis or congenital hip dysplasia were also found in some of our patients. It is feasible that in part this clinical variability is related to the type of mutation.

Two of our patients (F1 III:2, F2 III:1) had mild sensory findings on examination with no symptoms and normal SNAP and SSEP. In one of these patients (F1 III:2), a distal reduced ENFD was evident in the skin biopsy without any other underlying cause of neuropathy. Mild sensory symptoms and signs with a normal SNAP have already been described in patients who carry mutations in *BICD2* (Rossor *et al.*, 2015b). Thus, it is tempting to speculate that patients with *BICD2* mutations could present a sub-clinical sensory involvement due to small fiber neuropathy. Nevertheless, this finding might not be surprising given that a length-dependent reduction of intraepidermal innervation has been described in other motor syndromes like ALS (Weis *et al.*, 2011). By contrast,

patient F3 III:1 complained of sensory symptoms accompanied by abnormal sensory responses in NCS. For this reason the patient had been diagnosed with CMT2, although he was also diagnosed with diabetes mellitus some years after symptoms started and he developed lower limb oedema that could have interfered with the measurement of the nerve responses in the lower limbs. One patient was described previously that carried this same p.Ser681Leu change and who was diagnosed with AD CMT2. According to the clinical data reported, the patient had a foot deformity with weakness and wasting of distal muscles, yet no sensory loss. Studies of sensory nerve conduction, which we assume were altered, were not provided in the description of this patient (Bacquet *et al.*, 2018). Hence, while it is possible that certain *BICD2* mutations may be associated with a CMT2 phenotype, such as this p.Ser681Leu change, this cannot be assured. To date, the rest of mutations in the *BICD2* gene have been associated exclusively with motor involvement and patients appear to have normal sensory NCS.

The main differential diagnosis of *BICD2*-related disorders is SMALED caused by mutations in the *dynein cytoplasmic 1 heavy chain 1 (DYNC1H1)* gene (Weedon *et al.*, 2011; Harms *et al.*, 2012). Patients with mutations in this gene develop congenital or early onset lower limb weakness that follows a static or minimally progressive course (Harms *et al.*, 2012). Other features like arthrogryposis, foot deformities, scapular wasting or lumbar hyperlordosis may also occur (Weedon *et al.*, 2011; Harms *et al.*, 2012; Scoto *et al.*, 2015). Consequently, the clinical picture and course might be almost identical in both cases and indeed, the muscle MRI findings are also very similar (Rossor *et al.*, 2015b). However, subjects carrying pathogenic mutations in *DYNC1H1* may present cognitive impairment and epilepsy, phenomena that are not generally seen in *BICD2* patients (Vissers *et al.*, 2010; Harms *et al.*, 2012; Willemsen *et al.*, 2012; Poirier *et al.*, 2013; Fiorillo *et al.*, 2014; Scoto *et al.*, 2015), although two patients carrying the *de novo* p.Arg694Cys change in *BICD2* with a severe congenital phenotype that included bilateral perisylvian polymicrogyria have been reported



(Ravenscroft *et al.*, 2016) . Mutations in the *TRPV4* gene can also cause a similar phenotype: a pure motor neurogenic syndrome restricted to the lower limbs with antenatal onset, with a non-progressive course and often associated arthrogryposis (Fleury and Hagemant, 1985; Auer-Grumbach *et al.*, 2010). However additional features might also develop in these patients, such as vocal cord paralysis or sensory impairment (DeLong and Siddique, 1992; McEntagart *et al.*, 2005). Other differential factors include “equinovarus rather than calcaneovalgus foot deformities” [8,26] and the fact that “lower limb MRI does not show sparing of the thigh adductors, and semitendinosus, but instead shows sparing of biceps femoris” (Astrea *et al.*, 2012). Hence, it is again clear that muscle MRI can be very helpful in evaluating patients with a SMALED syndrome.

In conclusion, we report three new pathogenic mutations in the *BICD2* gene and describe the clinical variability related to this gene. Our study highlights the importance of muscle MRI in the diagnosis of *BICD2*-related neuromuscular disease, suggesting that MRI findings at the level of the pelvis and feet help to better define the pattern of muscle involvement associated with this condition. In addition, we present findings that raise the possibility of sensory involvement in this disease.

### **Acknowledgements**

The authors thank the patients for their willingness to collaborate in this study. The samples utilized in this study were provided by the “Biobanco La Fe” (PT17/0015/0043) and they were processed following standard operating procedures with the appropriate approval of the relevant Ethics and Scientific Committees.

**Author contributions:** T.S, V.L and MF designed the research. M.F, T.S, A.C-S, R.V, H.A-E, JF.V-C, R..S, E.M and J.J.V performed the clinical research and provided the

patient information. V.L, A.S-M and C.E performed the genetic studies. M.F, T.S and V.L elaborated the manuscript.

### **Study funding:**

This project was funded by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)–ERDF [Grant PI12/00946 to TS] and by the Generalitat Valenciana [Grant PROMETEO/2018/135 to TS and CE]. The “CIBERER” is an initiative of the ISCIII. MF and HA-E received a grant from the Instituto de Investigación Sanitaria La Fe [2015/0085 and 2017/0351 respectively] and ASM from the Foundation Per Amor a l'Art (FPAA). Part of the equipment employed in this work has been funded by Generalitat Valenciana and co-financed with ERDF funds (OP ERDF of Comunitat Valenciana 2014-2020).

### **References**

- [1] Neveling K, Martinez-Carrera LA, Hölker I, et al. Mutations in BICD2, which encodes a golgin and important motor adaptor, cause congenital autosomal-dominant spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet* 2013; 92: 946–954.
- [2] Oates EC, Rossor AM, Hafezparast M, et al. Mutations in BICD2 cause dominant congenital spinal muscular atrophy and hereditary spastic paraplegia. *Am J Hum Genet* 2013; 92: 965–973.
- [3] Peeters K, Litvinenko I, Asselbergh B, et al. Molecular defects in the motor adaptor BICD2 cause proximal spinal muscular atrophy with autosomal-dominant inheritance. *Am J Hum Genet* 2013; 92: 955–964.
- [4] Hoogenraad CC, Wulf P, Schiefermeier N, et al. Bicaudal D induces selective dynein-mediated microtubule minus end-directed transport. *EMBO J* 2003; 22: 6004–6015.

- [5] Splinter D, Tanenbaum ME, Lindqvist A, et al. Bicaudal D2, dynein, and kinesin-1 associate with nuclear pore complexes and regulate centrosome and nuclear positioning during mitotic entry. *PLoS Biol*; 8. Epub ahead of print April 2010. DOI: 10.1371/journal.pbio.1000350.
- [6] Grigoriev I, Splinter D, Keijzer N, et al. Rab6 Regulates Transport and Targeting of Exocytotic Carriers. *Dev Cell* 2007; 13: 305–314.
- [7] Rossor AM, Oates EC, Salter HK, et al. Phenotypic and molecular insights into spinal muscular atrophy due to mutations in BICD2. *Brain* 2015; 138: 293–310.
- [8] Bansagi B, Griffin H, Ramesh V, et al. The p.Ser107Leu in *BICD2* is a mutation ‘hot spot’ causing distal spinal muscular atrophy. *Brain* 2015; 138: e391–e391.
- [9] Synofzik M, Martinez-Carrera L a, Lindig T, et al. Dominant spinal muscular atrophy due to BICD2: a novel mutation refines the phenotype. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2014; 85: 590–2.
- [10] Unger A, Dekomien G, G??tsches A, et al. Expanding the phenotype of BICD2 mutations toward skeletal muscle involvement. *Neurology* 2016; 87: 2235–2243.
- [11] Rossor AM, Oates EC, Salter HK, et al. Phenotypic and molecular insights into spinal muscular atrophy due to mutations in BICD2. *Brain* 2015; 138: 293–310.
- [12] Bacquet J, Stojkovic T, Boyer A, et al. Molecular diagnosis of inherited peripheral neuropathies by targeted next-generation sequencing: Molecular spectrum delineation. *BMJ Open* 2018; 8: e021632.
- [13] Souza PVS, Pinto WBVR, Aivazoglou LU, et al. Distal myopathy due to BICD2 mutations. *Clin Neurol Neurosurg* 2018; 165: 47–49.
- [14] Sivera R, Sevilla T, Vílchez JJ, et al. Charcot-Marie-Tooth disease: Genetic and clinical spectrum in a Spanish clinical series. *Neurology* 2013; 81: 1617–1625.

- [15] Lupo V, Frasquet M, Sánchez-Monteaagudo A, et al. Characterising the phenotype and mode of inheritance of patients with inherited peripheral neuropathies carrying MME mutations. *J Med Genet*. Epub ahead of print 2018. DOI: 10.1136/jmedgenet-2018-105650.
- [16] Sivera R, Espinós C, Vílchez JJ, et al. Phenotypical features of the p.R120W mutation in the GDAP1 gene causing autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease. *J Peripher Nerv Syst* 2010; 15: 334–344.
- [17] Sommer C, Lauria G. Skin biopsy in the management of peripheral neuropathy. *Lancet Neurology* 2007; 6: 632–642.
- [18] Weis J, Katona I, Müller-Newen G, et al. *Small-fiber neuropathy in patients with ALS*. 2011.
- [19] Weedon MN, Hastings R, Caswell R, et al. Exome sequencing identifies a DYNC1H1 mutation in a large pedigree with dominant Axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Am J Hum Genet* 2011; 89: 308–312.
- [20] Harms MB, Ori-McKenney KM, Scoto M, et al. Mutations in the tail domain of DYNC1H1 cause dominant spinal muscular atrophy. *Neurology* 2012; 78: 1714–20.
- [21] Scoto M, Rossor AM, Harms MB, et al. Novel mutations expand the clinical spectrum of DYNC1H1-associated spinal muscular atrophy. *Neurology* 2015; 84: 668–679.
- [22] Vissers LELM, de Ligt J, Gilissen C, et al. A de novo paradigm for mental retardation. *Nat Genet* 2010; 42: 1109.
- [23] Willemsen MH, Vissers LEL, Willemsen MAAP, et al. Mutations in DYNC1H1 cause severe intellectual disability with neuronal migration defects. *J Med Genet* 2012; 49: 179–183.

- [24] Poirier K, Lebrun N, Broix L, et al. Mutations in TUBG1, DYNC1H1, KIF5C and KIF2A cause malformations of cortical development and microcephaly. *Nat Genet* 2013; 45: 639–647.
- [25] Fiorillo C, Moro F, Yi J, et al. Novel dynein DYNC1H1 neck and motor domain mutations link distal spinal muscular atrophy and abnormal cortical development. *Hum Mutat* 2014; 35: 298–302.
- [26] Ravenscroft G, Di Donato N, Hahn G, et al. Recurrent de novo BICD2 mutation associated with arthrogryposis multiplex congenita and bilateral perisylvian polymicrogyria. *Neuromuscul Disord* 2016; 26: 744–748.
- [27] Fleury P, Hagemant G. *A dominantly inherited lower motor neuron disorder presenting at birth with associated arthrogryposis*. 1985.
- [28] Auer-Grumbach M, Olschewski A, Papi L, et al. Alterations in the ankyrin domain of TRPV4 cause congenital distal SMA, scapulo-peroneal SMA and HMSN2C. *Nat Genet* 2010; 42: 160–164.
- [29] DeLong R, Siddique T. A Large New England Kindred with Autosomal Dominant Neurogenic Scapulo-peroneal Amyotrophy with Unique Features. *Arch Neurol* 1992; 49: 905–908.
- [30] McEntagart ME, Reid SL, Irthum A, et al. Confirmation of a hereditary motor and sensory neuropathy IIC locus at chromosome 12q23-q24. *Ann Neurol* 2005; 57: 293–297.
- [31] Astrea G, Brisca G, Fiorillo C, et al. Muscle MRI in TRPV4-related congenital distal SMA. *Neurology* 2012; 78: 364–365.

## Table legends

### Table 1. Clinical characteristics of the patients carrying mutations in *BICD2*

<sup>a</sup>Foot deformities includes: Achilles tendon contractures; pes cavus; talipes equinovarus; calcaneovalgus foot; hammer toes and hallux valgus. UL, upper limbs; LL, lower limbs; M, male; F, female; CTS, carpal tunnel syndrome.

## Figure legends

### Figure 1. The pedigrees of all five families carrying mutations in *BICD2*.

The arrows indicate the probands and the affected individuals are shown in black. Individuals who were reported to be affected but who were not available for examination are shown in gray. \*DNA sample available for segregation studies by Sanger sequencing.

### Figure 2. Muscle MRI at the pelvic level in patients carrying *BICD2*

**mutations.** There was selective fatty infiltration of the gluteus medius and minimus (arrows) in patient: F3 III:1 (C); F4 III:1 (D); F4 VI:1 (E); F4 IV:2 (F) and F2 IV:1 (image not shown). In the rest of the patients the MRI analysis at this level was normal, as shown in F1 IV:1 (A); and F2 III:1 (B). The age (in years) at which MRI was performed is indicated in the images.

### Figure 3. Muscle MRI at the thigh and lower leg level of individuals carrying *BICD2* mutations.

Muscle MRI of the thigh (A-F) and lower leg (G-L). At the level of the thigh, the muscles most affected were the rectus femoris (rf) and vastus lateralis (vl), although a variable degree of fatty infiltration was evident in the rest of the muscles in different patients. The best-preserved muscles at this level were the adductors (a), gracilis (g) and especially, the semitendinosus (st), which was often hypertrophic. The most severely affected muscles at the mid-calf

level were the medial and lateral gastrocnemius (meG and laG), with a different degree of involvement of the other muscles and preservation of the peroneal compartment (white asterisk). The MRI panels correspond to the following subjects: F1 IV:1 (26 years old: A and G); F2 III:1 (54 years old: B and H); F3 III:1 (50 years old: C and I); F4 III:1 (47 years old: D and J); F4 IV:1 (15 years old: E and K); F5 II:1 (9 years old: F and L).

**Figure 4. Muscle MRI at the foot level.**

Fatty infiltration of intrinsic foot muscles was only evident in two patients: F2 III:1 (B) and F4 III:1 (E). The rest of the MRI panels correspond to: F1 III:2 (A); F2 IV:1 (C); F3 III:1 (D); F4 IV:2 (F)

**Figure 5. Skin biopsies immunostained for protein gene product 9.5 (PGP 9.5) to study the epidermal nerve fiber density (ENFD) in patients carrying *BICD2* mutations.**

Skin biopsies immunostained for PGP 9.5 showing the skin innervation in the distal lower limb of patient F2 III:1 (A) and a control patient (B). Arrows indicate intraepidermal nerve fibers. There was a marked reduction in ENFD that followed a length-dependent pattern in patient F2 III:1

## **Supplementary material**

### **Supplementary table 1. Missense mutations identified in the *BICD2* gene and in silico pathogenicity predictions.**

Genome assembly GRCh37 (hg19) was used for chromosome position. The Human Genome Variation Society (HGVS) nomenclature and RefSeq accession number NM\_001003800 were used for the description of genetic mutations identified in *BICD2*. rs ID, variant identification tag assigned by NCBI (National Center for Biotechnology Information). <sup>a</sup> Previously classified as pathogenic “hot spot” mutation: Bansagi B et al., Brain. 2015 Nov;138(Pt 11):e391. <sup>b</sup> Previously described as pathogenic: Bacquet J. et al., BMJ Open. 2018 Oct 28;8(10):e021632.

### **Supplementary table 2. Electrophysiological data of patients carrying mutations in *BICD2***

EMG, electromyography; EDB, extensor digitorum brevis; CMAP, compound muscle action potential (mV); CV, conduction velocity (m/s); SNAP, sensory nerve action potential (microV); ND, not done; NR, no response; LL, lower limbs; UL, upper limbs; NA, not available. <sup>a</sup> Patient with carpal tunnel syndrome.

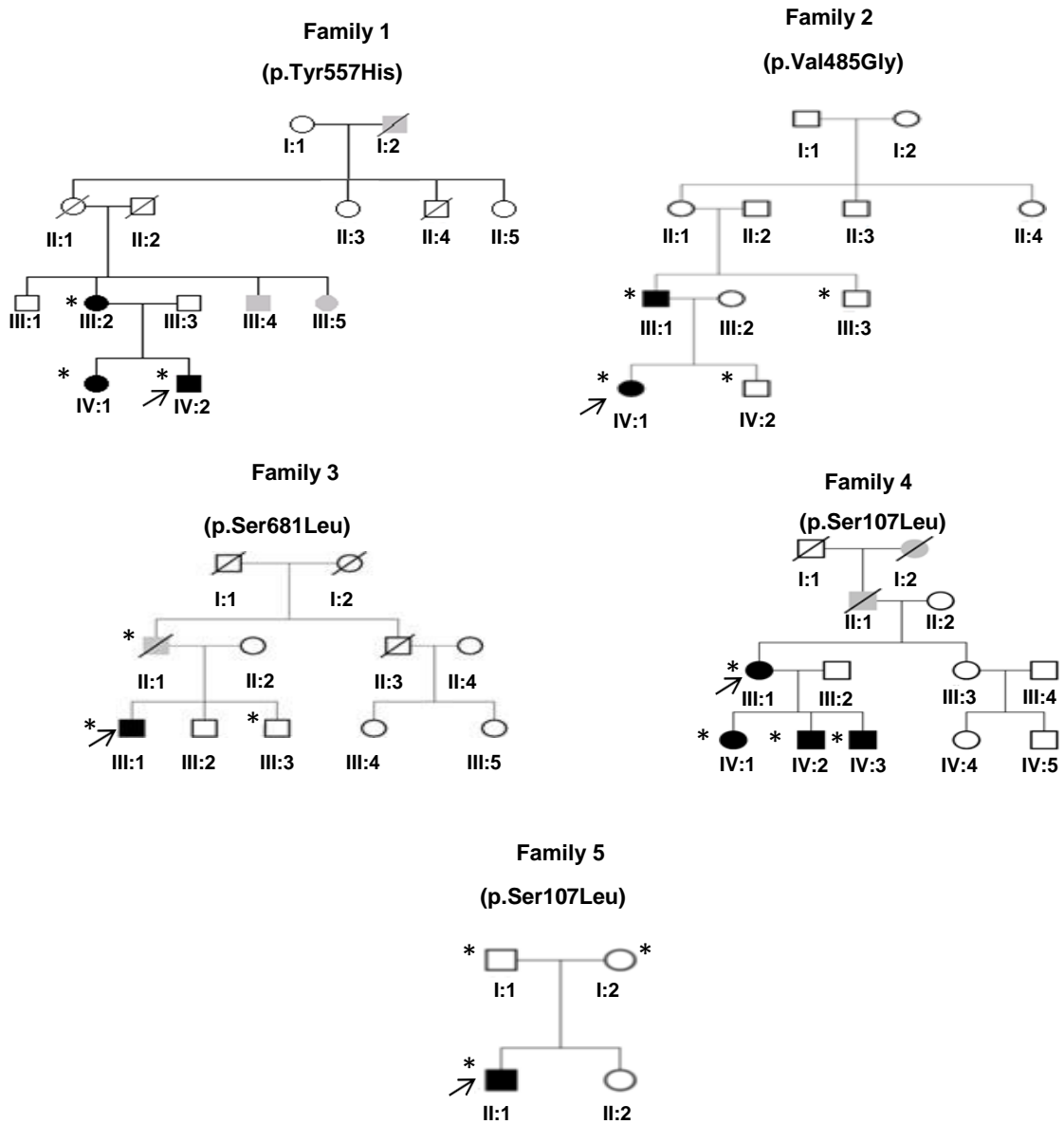


**Table 1. Clinical characteristics of the patients carrying mutations in *BICD2***

Patient Age (Sex)	Age at onset	Initial symptoms		Weakness		Sensory symptoms	Sensory loss on examination	Reflexes	Foot deformity <sup>a</sup>	Other features
		UL	LL	UL	LL					
F1 III:2. 50 (F)	-	Asymptomatic	No	No	No	No	Altered vibratory sensation in LL	Brisk in LL	Yes	
F1 IV:1. 26(F)	Childhood	Foot deformity	No	Distal	No	No	No	Normal	Yes	Hallux valgus and hammertoes surgery
F1 IV:2. 16 (M)	13	Foot deformity, difficulty practising sports	No	No	No	No	No	Absent in LL	Yes	Scapular winging
F2 III:1. 53 (M)	-	Asymptomatic	No	No	No	No	Altered vibratory sensation in LL	Ankle reflex absent	Yes	
F2 IV:1. 19 (F)	Early childhood	Delayed walking, tripping, falls.	No	Proximal and distal	No	No	No	Normal	Yes	Extensor plantar responses
F3 III:1. 50 (M)	45	Difficulty in climbing stairs, difficulty in walking on heels and toes	No	Proximal and distal	Yes: pain in hands and feet	Altered vibratory and pinprick sensation in LL and UL		Absent right ankle reflex	Yes	Lumbar hyperlordosis. Scoliosis. Diabetes mellitus detected at age 52. Lower limb edema
F4 III:1 47 (F)	Birth	Foot deformity. Difficulty in running	Yes	Proximal	Yes (CTS)	No	No	Absent in LL	Yes	Shoulder girdle atrophy. Scoliosis. Lumbar hyperlordosis.
F4 IV:1 14 (F)	Childhood	Difficulty in running, climbing stairs	No	Proximal and distal	No	No	No	Knee reflexes absent	Yes	Congenital hip dislocation. Scoliosis. Lumbar hyperlordosis. Waddling gait.
F4 IV:2 10 (M)	Childhood	Waddling gait, Difficulty in climbing stairs	No	Proximal and distal	No	No	No	Reduced knee reflex	Yes	Pseudo-Gowers sign
F4 IV:3 8 (M)	-	Asymptomatic	No	Proximal	No	No	No	Reduced knee reflex	No	Difficulty in rising from floor
F5 II:1 12 (M)	Birth	Foot deformity, Delayed walking .	No	Proximal and distal	No	No	No	Absent in LL	Yes	Foot surgery. Scapular winging.

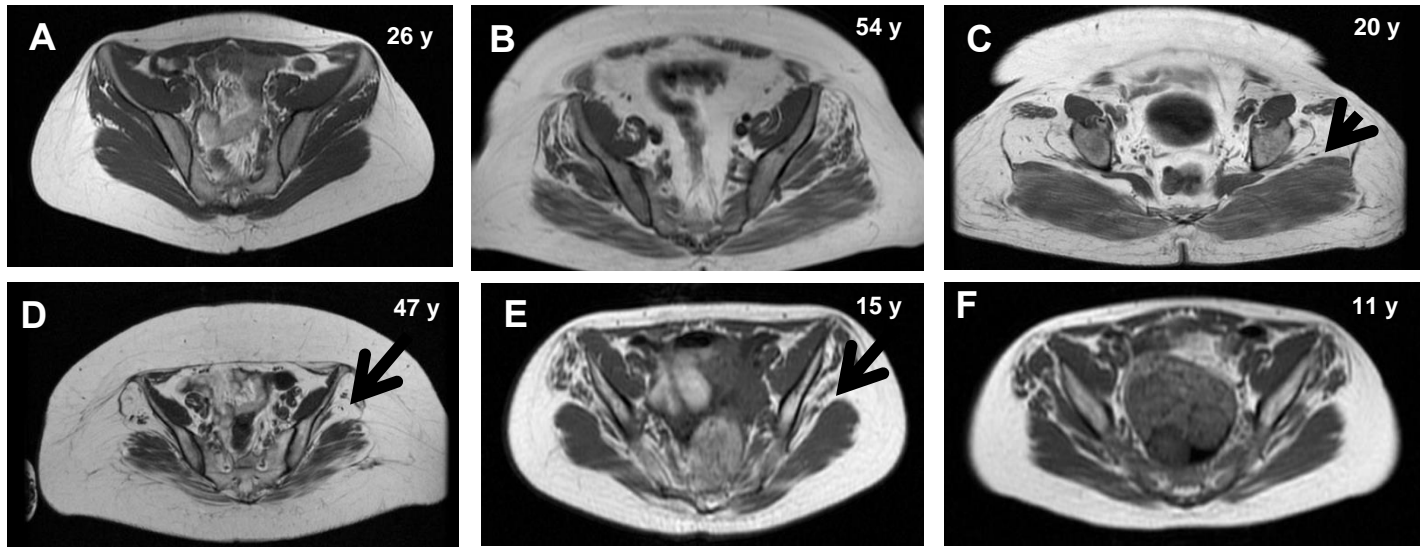
**a Foot deformity includes: Achilles tendon contractures; pes cavus; talipes equinovarus; calcaneovalgus foot; hammertoes and hallux valgus. UL, upper limbs; LL, lower limbs; M, male; F, female; CTS, carpal tunnel syndrome.**

**Figure 1. The pedigrees of all five families carrying mutations in *BICD2*.**



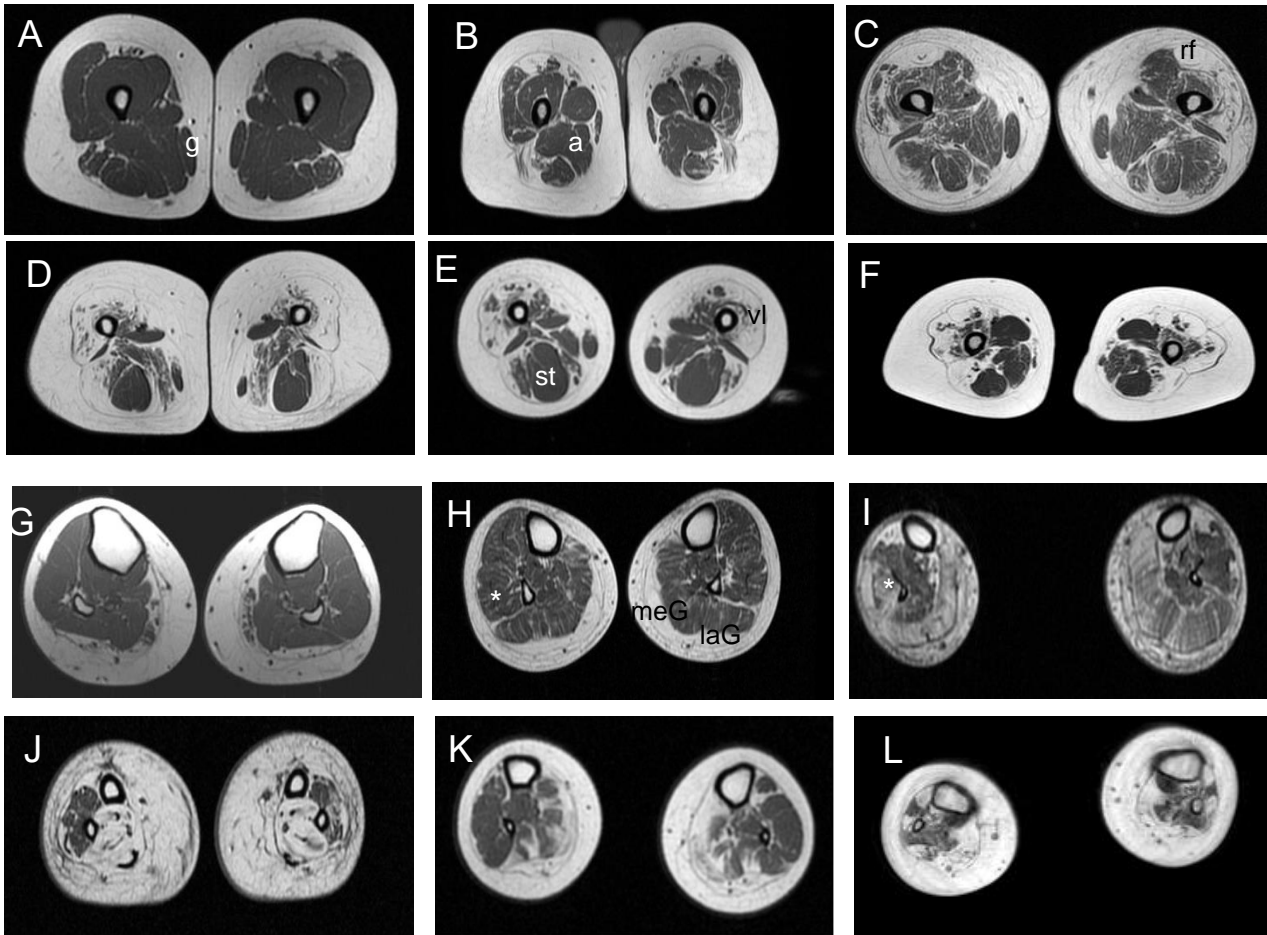
The arrows indicate the probands and the affected individuals are shown in black. Individuals who were reported to be affected but who were not available for examination are shown in gray. \*DNA sample available for segregation studies by Sanger sequencing

Figure 2. Muscle MRI at the pelvic level in patients carrying *BICD2* mutations.

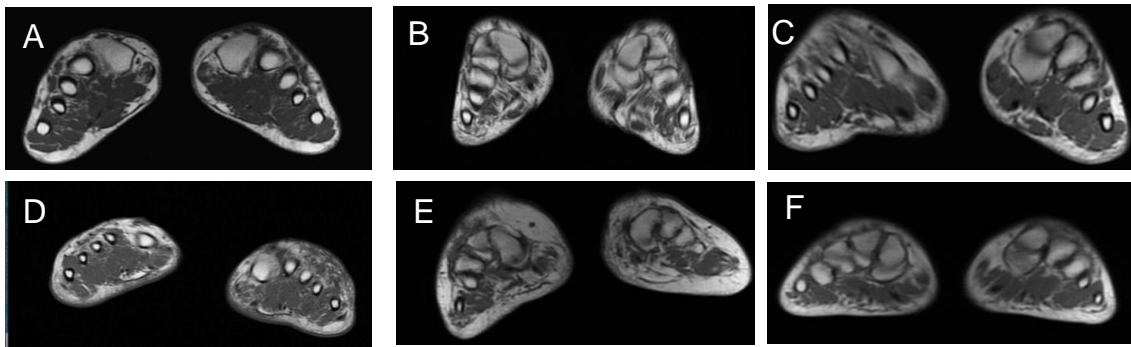


There was selective fatty infiltration of the gluteus medius and minimus (arrows) in patient: F3 III:1 (C); F4 III:1 (D); F4 VI:1 (E); F4 IV:2 (F) and F2 IV:1 (image not shown). In the rest of the patients the MRI analysis at this level was normal, as shown in F1 IV:1 (A); and F2 III:1 (B). The age (in years) at which MRI was performed is indicated in the images.

**Figure 3. Muscle MRI at the thigh and lower leg level of individuals carrying *BICD2* mutations.**

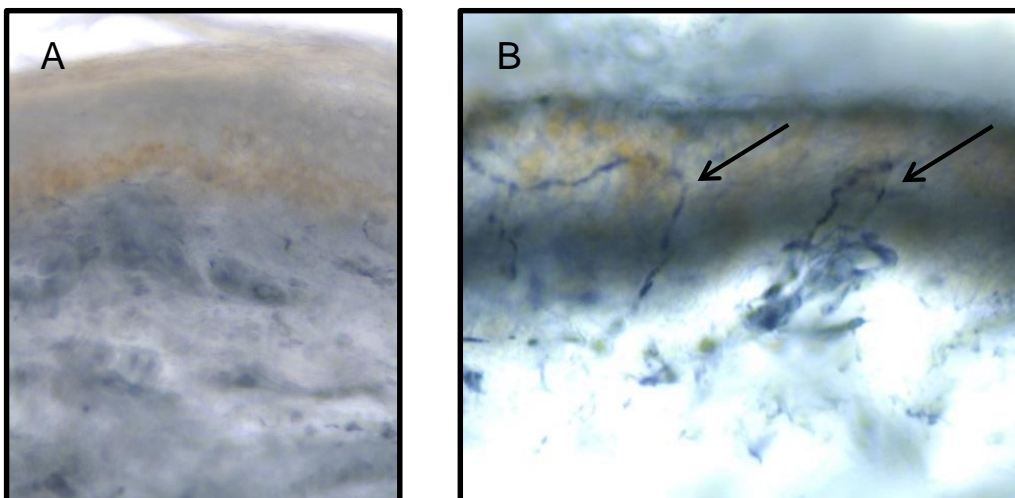


Muscle MRI of the thigh (A-F) and lower leg (G-L). At the level of the thigh, the muscles most affected were the rectus femoris (rf) and vastus lateralis (vl), although a variable degree of fatty infiltration was evident in the rest of the muscles in different patients. The best-preserved muscles at this level were the adductors (a), gracilis (g) and especially, the semitendinosus (st), which was often hypertrophic. The most severely affected muscles at the mid-calf level were the medial and lateral gastrocnemius (meG and laG), with a different degree of involvement of the other muscles and preservation of the peroneal compartment (white asterisk). The MRI panels correspond to the following subjects: F1 IV:1 (26 years old: A and G); F2 III:1 (54 years old: B and H); F3 III:1 (50 years old: C and I); F4 III:1 (47 years old: D and J); F4 IV:1 (15 years old: E and K); F5 II:1 (9 years old: F and L).

**Figure 4. Muscle MRI at the foot level.**

Fatty infiltration of intrinsic foot muscles was only evident in two patients: F2 III:1 (B) and F4 III:1 (E). The rest of the MRI panels correspond to: F1 III:2 (A); F2 IV:1 (C); F3 III:1 (D); F4 IV:2 (F)

**Figure 5. Skin biopsies immunostained for protein gene product 9.5 (PGP 9.5) to study the epidermal nerve fiber density (ENFD) in patients carrying *BICD2* mutations.**



Skin biopsies immunostained for PGP 9.5 showing the skin innervation in the distal lower limb of patient F2 III:1 (A) and a control patient (B). Arrows indicate intraepidermal nerve fibers. There was a marked reduction in ENFD that followed a length-dependent pattern in patient F2 III:1

**Supplementary table 1.** Missense mutations identified in *BICD2* gene and in silico pathogenicity predictions.

Family number	Chromosome position	cDNA (HGVS)	Protein (HGVS)	rs ID	PROVEAN score (prediction)	SIFT score (prediction)	Polyphen-2 score (prediction)	GERP score	PhyloP score
4,5	Chr9:95491439	c.320C>T	p.Ser107Leu	rs398123028 <sup>a</sup>	-4.32 (deleterious)	0.002 (damaging)	0.999 (probably damaging)	5.27	3.715
2	Chr95481473	c.1454T>G	p.Val485Gly	Novel	-3.85 (deleterious)	0.100 (tolerated)	0.813 (possibly damaging)	5.39	3.121
1	Chr95481258	c.1669T>C	p.Tyr557His	Novel	-2.23 (neutral)	0.044 (damaging)	1 (probably damaging)	4.23	3.121
3	Chr95480885	c.2042C>T	p.Ser681Leu	<sup>b</sup>	-5.41 (deleterious)	0.001 (damaging)	1 (probably damaging)	5.39	5.57

Genome assembly GRCh37 (hg19) was used for chromosome position. The Human Genome Variation Society (HGVS) nomenclature and RefSeq accession number NM\_001003800 were used for the description of genetic mutations identified in *BICD2*. rs ID, variant identification tag assigned by NCBI (National Center for Biotechnology Information). <sup>a</sup>Previously classified as pathogenic “hot spot” mutation: Bansagi B et al., Brain. 2015 Nov;138(Pt 11):e391. <sup>b</sup>Previously described as pathogenic: Bacquet J. et al., BMJ Open. 2018 Oct 28;8(10):e021632.

**p.S107L**

protein features	start (aa)	end (aa)	feature	details
	20	269	COILED	Potential, lost

**p.S681L**

protein features	start (aa)	end (aa)	feature	details
	663	803	REGION	Interacts with RAB6A (By similarity), lost
	666	808	COILED	Potential, lost
	691	691	MOD_RES	Phosphothreonine, might get lost (downstream of altered splice site)
	821	821	MOD_RES	Phosphothreonine, might get lost (downstream of altered splice site)
	823	823	MOD_RES	Phosphoserine, might get lost (downstream of altered splice site)

**p.V485G**

protein features	start (aa)	end (aa)	feature	details
	338	537	COILED	Potential, lost
	582	582	MOD_RES	Phosphoserine, might get lost (downstream of altered splice site)
	663	803	REGION	Interacts with RAB6A (By similarity), might get lost (downstream of altered splice site)
	666	808	COILED	Potential, might get lost (downstream of altered splice site)
	691	691	MOD_RES	Phosphothreonine, might get lost (downstream of altered splice site)
	821	821	MOD_RES	Phosphothreonine, might get lost (downstream of altered splice site)
	823	823	MOD_RES	Phosphoserine, might get lost (downstream of altered splice site)

**p.Y557H**

protein features	no protein features affected			
------------------	------------------------------	--	--	--

ANEXO: Trabajos publicados. Artículo 2

Database: Missense/nonsense - Single base-pair substitutions in coding regions are represented as a triplet codon change. There are currently 28 mutations available in this category. These data are sorted by location.

Missense/nonsense		Splicing		Regulatory		Small deletions		Small insertions		Small indels		Gross deletions		Gross insertions		Complex		Repeats	
28 mutations		No mutations		No mutations		No mutations		No mutations		No mutations		No mutations		No mutations		No mutations		No mutations	
HGMD accession	HGMD codon change	HGMD amino acid change	HGYS (nucleotide)	HGYS (protein)	Variant class	Reported phenotype	Small insertions	Small indels	Gross deletions	Gross insertions	Complex	Repeats	Reference		Extra information				
CM134944	AAG-AGG	Lys90Arg	c.269A>G	p.K90R	DM	Spinal muscular atrophy, modifier of	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	Neveling (2013) <a href="#">Am J Hum Genet 92, 946</a> Lalibonza (2016) <a href="#">Orphanet J Rare Dis 11, 118</a> [Additional report]	<a href="#">h58</a> <a href="#">h19</a> <a href="#">COM</a> <a href="#">G6G</a> <a href="#">dSNP</a> <a href="#">FREQ</a>					
CM134942	TCG-TTG	Ser107Leu	c.320C>I	p.S107L	DM	Spinal muscular atrophy, autosomal dominant	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	Neveling (2013) <a href="#">Am J Hum Genet 92, 946</a> Oates (2013) <a href="#">Am J Hum Genet 92, 946</a> [Additional phenotype] Oates (2013) <a href="#">Am J Hum Genet 92, 946</a> [Functional characterization] 6 more references(4)...	<a href="#">h58</a> <a href="#">h19</a> <a href="#">G6G</a> <a href="#">dSNP</a>					
CM134943	AAC-ACC	Asn188Thr	c.563A>C	p.N188T	DM	Spinal muscular atrophy, autosomal dominant	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	Neveling (2013) <a href="#">Am J Hum Genet 92, 946</a> Royal (2017) <a href="#">Cell 166, 3041</a> [Functional characterization]	<a href="#">h58</a> <a href="#">h19</a> <a href="#">dSNP</a>					
CM134946	ATC-TTC	Ile189Phe	c.565A>T	p.I189F	DM	Spinal muscular atrophy with upper motor neuron features	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	Oates (2013) <a href="#">Am J Hum Genet 92, 965</a> Royal (2013) <a href="#">Ezra 188, 333</a> [Additional phenotype] Royal (2017) <a href="#">Cell 166, 3041</a> [Functional characterization]	<a href="#">h58</a> <a href="#">h19</a>					
CM1711004	CAA-CGA	Gln194Arg	c.581A>G	p.Q194R	DM	Congenital muscular atrophy with arthrogryposis multiplex and respiratory insufficiency	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	Storbeck (2017) <a href="#">Eur J Hum Genet 25, 1040</a>	<a href="#">h58</a> <a href="#">h19</a>					
CM1618248	GCC-ACC	Ala271Thr	c. Not yet available	p. Not yet available	DM	Oculocutaneous albinism, arthrogryposis, foot deformities and hip dislocation	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	Abasig-Thomas (2016) <a href="#">Acta Derm Venereol 96, 314</a>	<a href="#">COM</a>					
CM152111	GCG-GTG	Ala360Val	c.1079C>T	p.A360V	DM	Charcot-Marie-Tooth disease 1	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	Drew (2015) <a href="#">Mol Genet Genomic Med 3, 143</a>	<a href="#">h58</a> <a href="#">h19</a> <a href="#">G6G</a> <a href="#">dSNP</a>					
CM173391	CGC-CAC	Arg399His	c.1196G>A	p.R399H	DM	Amyotrophic lateral sclerosis, juvenile	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	Huang (2017) <a href="#">Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener 18, 454</a>	<a href="#">h58</a> <a href="#">h19</a> <a href="#">G6G</a> <a href="#">dSNP</a>					
CM161253	CGC-TGC	Arg493Cys	c.1477C>T	p.R493C	DM	Arthrogryposis, phenotypic modifier of	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	Bayram (2016) <a href="#">J Clin Invest 126, 762</a>	<a href="#">h58</a> <a href="#">h19</a> <a href="#">COM</a> <a href="#">G6G</a> <a href="#">dSNP</a>					
CM134947	CGG-CCG	Arg501Pro	c.1502G>C	p.R501P	DM	Spinal muscular atrophy with upper motor neuron features	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	Oates (2013) <a href="#">Am J Hum Genet 92, 965</a> Royal (2013) <a href="#">Ezra 188, 333</a> [Additional phenotype]	<a href="#">h58</a> <a href="#">h19</a> <a href="#">dSNP</a>					
CM134948	AAG-ACG	Lys508Thr	c.1523A>C	p.K508T	DM	Spastic paraplegia	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	Oates (2013) <a href="#">Am J Hum Genet 92, 965</a> Royal (2013) <a href="#">Ezra 188, 333</a> [Additional phenotype]	<a href="#">h58</a> <a href="#">h19</a> <a href="#">dSNP</a>					
CM169957	GGC-AGC	Gly514Ser	c.1540G>A	p.G514S	DM	Peripheral neuropathy	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	Lashyokva (2016) <a href="#">Orphanet J Rare Dis 11, 118</a>	<a href="#">h58</a> <a href="#">h19</a> <a href="#">COM</a> <a href="#">G6G</a> <a href="#">dSNP</a>					
CM151440	GCC-GTC	Ala535Val	c.1604C>T	p.A535V	DM	Spinal muscular atrophy, lower extremity predominant	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	Rosbox (2015) <a href="#">Brain 138, 293</a>	<a href="#">h58</a> <a href="#">h19</a>					
CM1711005	TGC-TGG	Cys542Trp	c.1626C>G	p.C542W	DM	Congenital muscular atrophy with arthrogryposis multiplex and respiratory insufficiency	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	Storbeck (2017) <a href="#">Eur J Hum Genet 25, 1040</a>	<a href="#">h58</a> <a href="#">h19</a>					
CM181726	TAC-TGC	Tyr556Cys	c.1667A>G	p.Y556C	DM	Spinal muscular atrophy, lower extremity, predominant 2	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	Yoshioka (2018) <a href="#">Brain Dev 40, 343</a>	<a href="#">h58</a> <a href="#">h19</a>					
CM141042	TGG-TTG	Ser608Leu	c.1823C>T	p.S608L	DM	Spastic paraplegia	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	Novarino (2014) <a href="#">Science 343, 506</a>	<a href="#">h58</a> <a href="#">h19</a> <a href="#">COM</a> <a href="#">G6G</a> <a href="#">dSNP</a>					
CM1716489	GCC-GAC	Ala644Asp	c.1931C>A	p.A644D	DM	Spinal muscular atrophy, lower extremity, predominant 2	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	Meng (2017) <a href="#">JAMA Pediatr 171, 173433</a>	<a href="#">h58</a> <a href="#">h19</a> <a href="#">COM</a>					
CM152112	GTG-TTG	Val663Leu	c.1993G>I	p.V663L	DM	Motor neuropathy, hereditary	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	Drew (2015) <a href="#">Mol Genet Genomic Med 3, 143</a>	<a href="#">h58</a> <a href="#">h19</a> <a href="#">dSNP</a>					
CM164101	CTC-CGC	Leu683Arg	c.2048T>G	p.L683R	DM	Spinal muscular atrophy, lower extremity, predominant	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	Fiorillo (2016) <a href="#">Eur J Neurol 23, e19</a>	<a href="#">h58</a> <a href="#">h19</a>					
CM1613323	CGG-TGC	Arg694Cys	c.2080C>I	p.R694C	DM	Arthrogryposis multiplex congenita & bilateral perisylvian polymicrogyria	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	Ravenscroft (2016) <a href="#">Neuromuscul Disord 26, 744</a>	<a href="#">h58</a> <a href="#">h19</a> <a href="#">COM</a> <a href="#">G6G</a> <a href="#">dSNP</a>					
CM181114	AAC-AAG	Asn700Lys	c.2100C>G	p.N700K	DM	Arthrogryposis with pterygia	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	Ahmed (2018) <a href="#">Am J Med Genet A 176, 359</a>	<a href="#">h58</a> <a href="#">h19</a>					
CM134941	ACG-ATG	Thr703Met	c.2108C>I	p.T703M	DM	Spinal muscular atrophy, autosomal dominant	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	No mutations	Neveling (2013) <a href="#">Am J Hum Genet 92, 946</a> Usher (2016) <a href="#">Neurosci 87, 1033</a> [Additional phenotype] Usher (2016) <a href="#">Neurosci 87, 1034</a> [Functional characterization]	<a href="#">h58</a> <a href="#">h19</a> <a href="#">G6G</a> <a href="#">dSNP</a>					



CM1618810	GAG-GGG	Glu705Gly	c.2114A>G	p.E705G	<b>DM</b>	Multiple congenital anomalies	<a href="#">Reiterer (2016) Genet Med 18, 696</a>	<a href="#">Help</a> <a href="#">COM</a>
CM181915	GAG-GGG	Glu732Gly	c.2195A>G	p.E732G	<b>DM</b>	Motor neuropathy	<a href="#">Hartley (2018) Clin Genet 93, 301</a>	<a href="#">Help</a>
CM169987	AAG-AAT	Lys734Asn	c.2202G>T	p.K734N	<b>DM</b>	Spinal muscular atrophy; autosomal dominant	<a href="#">Rudnik-Schöneborn (2016) Muscle Nerve 54, 496</a>	<a href="#">Help</a>
CM1313441	CGT-TGT	Arg747Cys	c.2239C>T	p.R747C	<b>DM</b>	Spinal muscular atrophy; autosomal dominant	<a href="#">Symofnik (2014) J Neurol Neurosurg Psychiatry 85, 590</a>	<a href="#">Help</a> <a href="#">CG</a>
CM134945	GAG-GGG	Glu774Gly	c.2321A>G	p.E774G	<b>DM</b>	Spinal muscular atrophy; autosomal dominant	<a href="#">Peeters (2013) Am J Hum Genet 92, 955</a> <a href="#">Zosser (2015) Eur J Hum Genet 23 [Additional phenotype]</a> <a href="#">Zosser (2015) Eur J Hum Genet 23 [Additional report]</a>	<a href="#">Help</a> <a href="#">DM</a> <a href="#">DSNF</a>
CM169986	GGG-AGG	Gly839Arg	c.2515G>A	p.G839R	<b>DM</b>	Spinal muscular atrophy; autosomal dominant	<a href="#">Rudnik-Schöneborn (2016) Muscle Nerve 54, 496</a>	<a href="#">Help</a> <a href="#">CG</a> <a href="#">DSNF</a>

**Supplementary table 2. Electrophysiological data of patients carrying mutations in *BICD2***

Patient/Age (years)	Motor nerves						Sensory nerves						EMG				
	Median nerve		Ulnar nerve		Peroneal nerve (EDB)		Median nerve		Ulnar nerve		Radial nerve			Sural nerve			
	CMAP	CV	CMAP	CV	CMAP	CV	CMAP	CV	CMAP	CV	CMAP	CV		CMAP	CV	CMAP	CV
F1 III:2/ 50	8.8	59.0	14.1	57.1	6.7	47.5	21.8	54.0	9.3	52.3	26.7	72.7	19.2	54.5	Chronic denervation in distal LL		
F1 IV:1/ 26	14.6	56.1	18.5	57.1	11.3	48.3	ND	ND	15	58.1	80	57.4	22	59.1	Chronic denervation in proximal and distal LL		
F1 IV:2/ 16	16.1	50	17.4	62.1	9.4	45.2	14.6	53.7	10.0	57.1	ND	ND	21.3	50	Chronic denervation in proximal and distal LL		
F2 III:1/ 54	12.7	58.5	12.1	56.9	4.1	52.5	29	59.0	8.1	63.8	37	69.7	18	61.4	Chronic denervation in proximal and distal LL		
F2 IV:1/ 19	10.4	67.1	ND	ND	9	54	51	61.2	ND	ND	ND	ND	44	65.1	Chronic denervation in proximal and distal LL > distal UL.		
F3 III:1/ 50	8.9	54.5	11.5	58.5	2.6	48.5	8.2	43.1	2.6	46.1	ND	ND	NR	NR	Chronic denervation in proximal and distal LL and distal UL.		
F4 III:1/ 46 <sup>a</sup>	10.3	55.5	13.4	64.1	2.6	ND	1.4	30.2	7.5	52.3	ND	ND	ND	ND	Chronic denervation in proximal and distal LL and proximal UL.		
F4 IV:1/ 15	ND	ND	15.0	ND	11.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	25.5	ND	Chronic denervation in proximal and distal LL		
F4 IV:2/ 11	ND	ND	ND	ND	8.9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	19.7	ND	Chronic denervation in proximal and distal LL		
F4 IV:3/ 8	ND	ND	ND	ND	7.0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	23.8	ND	Chronic denervation in proximal and distal LL		
F5 II:1/ 13	ND	ND	ND	ND	5.3	56	ND	ND	ND	ND	ND	ND	24.2	60	Chronic denervation in distal LL. No muscle activity recorded in vastus lateralis muscle.		

**EMG, electromyography; EDB, extensor digitorum brevis; CMAP, compound muscle action potential (mV); CV, conduction velocity (m/s); SNAP, sensory nerve action potential (microV); ND, not done; NR, no response; LL, lower limbs; UL, upper limbs; NA, not available.**

<sup>a</sup> Patient with carpal tunnel syndrome.

### Artículo 3

M Frasquet, M J Chumillas, J J Vílchez, C Márquez-Infante, F Palau, J F Vázquez-Costa, V Lupo, C Espinós, T Sevilla.

**Phenotype and natural history of inherited neuropathies caused by HSJ1 c.352+1G>A mutation.**

J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2016 Nov;87(11):1265-1268.

doi: 10.1136/jnnp-2015-312890. Epub 2016 Apr 15.

“This article has been accepted for publication in Journal of neurology, Neurosurgery, & Psychiatry, 2016 following peer review, and the Version of Record can be accessed online at 10.1136/jnnp-2015-312890”.



Phenotype and natural history of inherited neuropathies caused by HSJ1 c.352+1G>A mutation

M. Frasquet, MD, 1,2,3 MJ. Chumillas, MD,1,3,4 JJ. Vílchez, MD, PhD, 1,2,3,5 C. Márquez-Infante, MD, PhD, 6 F. Palau, MD, PhD, 3,7,8,9 JF. Vázquez-Costa, MD, 1,2,3 V. Lupo, PhD 3,7 C. Espinós, PhD,3,7, T. Sevilla, MD, PhD 1,2,3,5.

1 Neuromuscular Research Unit, Instituto de Investigación Sanitaria la Fe (IIS La Fe), Valencia, Spain.

2 Department of Neurology, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Valencia, Spain.

3 Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Spain.

4 Department of Clinical Neurophysiology, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Valencia, Spain.

5 Department of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain.

6 Department of Neurology, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Seville, Spain.

7 Program in Rare and Genetic Diseases and IBV/CSIC Associated Unit, Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF), Valencia, Spain

8 Department of Genetic and Molecular Medicine, Instituto Pediátrico de Enfermedades Raras (IPER), and Institut de Recerca Pediàtrica, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain.

9 Department of Pediatrics, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

\*Correspondence should be addressed to Dr. Teresa Sevilla, Department of Neurology, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Avenida Fernando Abril Martorell 106, 46026 Valencia, Spain;

sevilla\_ter@gva.es; Tel.(0034) 630037313. Fax. (0034) 961246241

Paper word count: 1028

Keywords: Charcot-Marie-Tooth disease; distal Hereditary Motor Neuropathy; HSJ1/DNAJB2;

## INTRODUCTION

Mutations in the HSJ1 (Heat-Shock Protein J1) gene, also called DNAJB2 (DnaJ[Hsp40] homolog, subfamily B, member 2), have been recently described as a cause of hereditary neuropathies. The HSJ1 c.352 +1G>A mutation in homozygote state has been reported as the causative mutation in a single family with autosomal recessive distal hereditary motor neuropathy (dHMN).[1] Since then, two other families with different HSJ1 mutations have been described: one with a dHMN phenotype and another with a Charcot-Marie-Tooth disease type 2 (CMT2) phenotype.[2]

We identified the HSJ1 c.352+1G>A mutation in ten patients who underwent long-lasting follow up. We describe their phenotype and clinical evolution.

## PATIENTS AND METHODS

Ten patients from five different Spanish families had been diagnosed with dHMN or CMT2 at two tertiary referral centers in Spain between 1976 and 2014. They all underwent neurological examination and electrophysiological studies with standard techniques.[3] Regular follow-up was performed in all cases and repeated electrophysiological studies were carried out in some patients.

All the families carried the HSJ1 c.352+1G>A homozygote pathogenic sequence variation. Family 1 was diagnosed by exome sequencing. Families 2 and 4 were diagnosed using a gene panel for genetic testing of CMT and dHMN. Families 3 and 5 were identified by mutational screening of the HSJ1 c.352+1G>A change, carried out in 52 patients of our registry with autosomal recessive dHMN or CMT2 who still had no molecular diagnosis. In all cases, mutation was confirmed by Sanger sequencing and a segregation analysis was performed whenever possible.

All the patients and relatives included in the present study signed informed consent. The research protocols were approved by the respective institutional board of the Ethics Committee of both hospitals.

## RESULTS

Pedigree information is illustrated in Figure 1 (supplementary file: Figure 1). Only one of our families had known consanguinity. It was remarkable that three of the families (Families 1, 2 and 5) originated from the same town.

Clinical data are summarized in Table 1.

**Table 1. Clinical features of patients with the *HSJ-1* c.352+1G>A mutation**

Individual	Age at Onset (Years)	First symptom	Age of first evaluation (Years)	Arm weakness Proximal-Distal	Leg weakness Proximal - Distal	Sensory loss	Reflexes	Ambulation	Last evaluation (Years)	Arm weakness Proximal-Distal	Leg weakness Proximal - Distal	Sensory loss	Ambulation	Other
Family 1														
III-1	14	Difficulty walking	39	None-None	Severe-Severe	Moderate	Absent	One crutch	50	None-Mild	Severe-Severe	Moderate	Wheelchair	YOPD
III-3	22	Stumbling, difficulty climbing stairs	28	None-None	Mild-Moderate	None	Absent	Unable to run. Unsteady gait.	40	None-None	Severe-Severe	Mild	Uses two crutches	
Family 2														
III-1	14	Cramps, difficulty climbing stairs	20	None-None	Mild-Mild	None	Reduced/Absent	Unable to run, unable to walk on heels.	35	None-None	Moderate-Severe	Mild	Steppage and waddling gait	
III-3	8	Stumbling, cramps	24	None-Mild	Mild-Severe	None	Reduced/Absent	Use cane	28	None- Mild	Moderate-Severe	Mild	Steppage and waddling gait	
III-5	16	Stumbling, difficulty climbing curbs	23	None-None	Mild-Mild	None	Reduced/Absent	Difficulty running, unable to walk on heels.	27	None-Mild	Mild-Moderate	None	Steppage gait.	
III-6	20	Cramps, difficulty running and climbing stairs	22	None-None	None-Mild	None	Reduced/Absent	Difficulty running, unable to walk on both toes.	22*	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A

ANEXO: Trabajos publicados. Artículo 3

Family 3														
II-5	31	Difficulty running, cramps	35	None-None	None-Moderate	Mild	Reduced/Absent	Difficulty walking on heels and toes. Unsteady gait.	74	Moderate-Moderate.	Severe-Severe	Severe	Wheelchair	Bulbar involvement. PEG.
II-7	25	Difficulty running, difficulty walking on heels and toes	30	None-None	None-Moderate	None	Reduced/Absent	Difficulty walking on heels and toes	60	Severe-Severe	Severe-Severe	Moderate	Bedridden.	Bulbar involvement. PEG. Deceased at 61 years.
Family 4														
III-1	16	Stumbling, Difficulty climbing stairs.	23	None-None	None-Mild	None	Reduced/Absent	Difficulty walking on heels and toes	35	None-None	Moderate-Severe	Mild	Steppage and waddling gait	
Family 5														
II-4	19	Stumbling, Difficulty walking	58	Moderate-Mild	Severe-Severe	Moderate	Absent	Wheelchair	63	Moderate-Mild	Severe-Severe	Severe	Wheelchair	Bulbar involvement. PEG. Behavioral changes. Deceased at 69

N.A: not applicable. (Patient F2/III-6 has been evaluated only once). YOPD: young-onset Parkinson Disease. PEG: Percutaneous endoscopic gastrostomy



Age of onset ranged between 8 and 31 years (median 17.50). The first reported symptoms were weakness and atrophy of distal lower limbs, which spread insidiously to proximal muscles. Only three patients (F1/III-1, F3/II-5 and F5/II-4) had altered sensation at the time of the first clinical assessment. After a median follow-up of 20.50 +/- 13.25 years (range 2-44) after first the symptoms appeared, all the patients developed sensory symptoms and only the two youngest patients still presented clinical pure motor impairment. The patients with a longer disease course developed weakness in their upper limbs, which always occurred when there was severe weakness of the lower limbs. The most severely affected patients were the oldest ones (F3/II-5, F3/II-7 and F5/II-4). They developed dysarthria, dysphagia, facial weakness and impairment of respiratory muscles, and required assisted ventilation and percutaneous endoscopic gastrostomy placement for feeding. Patients F3/II-7 and F5/II-4 died at 61 and 69 years respectively. In the last four years of their life, only their eye movements were preserved. In patient F5/II-4 behavioral changes with disinhibition, apathy and poor language production were noted when he was 63 years old, when muscular atrophy was already severe. Brain magnetic resonance imaging (MRI) showed mainly right fronto-temporal brain atrophy (Supplementary File: Figure 2). Patient F1/III-1 developed left-sided Parkinsonian symptoms at the age of 40. Brain SPECT imaging with DatSCAN showed reduced radiotracer uptake in the right striatum and the patient was diagnosed with young-onset Parkinson's disease (YOPD). The exome sequencing results showed that he carried three SNPs in genes related to Parkinson's disease. However, none of these three variants cosegregated with disease in his family (data not shown).

The initial electrophysiological findings for all our patients were chronic and acute denervation in the distal muscles of the lower limbs, and reduced compound motor axon potentials (CMAPs) in peripheral nerves of the lower limbs. CMAPs were relatively preserved in the upper limbs and conduction velocities fell within the normal limits. By means of the initial available electrophysiological studies, four patients were diagnosed with dHMN (F1/III-3, F2/III-3, F2/III-5 and III-6), while six patients were diagnosed with CMT2 (F1 III-1, F2/III-1, F3/II-5, F3 II/7, F4 III-1, F5/II-4) at the time of the first assessment. In two patients (F1/III-3, F2/III-3) with normal initial sensory responses, repeated nerve conduction studies showed abnormal sensory responses (Supplementary File: Table 2). Repeated electrophysiological studies revealed spreading denervation, first to the proximal muscles of the lower limbs, and then to the muscles of the upper limbs. The CMAPs in the upper limbs tended to decrease.

## DISCUSSION

In this study we found that the *HSJ1* c.352+1G>A mutation manifests both as dHMN and CMT2, and that some cases with an initial dHMN phenotype evolve into a CMT2 phenotype.

In our patients, the first symptom was distal muscle weakness in the lower limbs, which later spread to the proximal muscles, but with no initial sensory symptoms. After several years of follow-up, two of our patients who were initially diagnosed with dHMN developed clinical and electrophysiological sensory impairment, which started in lower limb nerves. Currently, only two of our patients have a dHMN phenotype, they are the youngest ones with shorter

disease evolution. These findings make us think that clinical and electrophysiological pure motor impairment occurs during the early disease course. Then, as the disease progresses, sensory disturbances in the lower limbs become apparent.

In the patients subjected to the longest follow-up time (more than 30 years after symptoms onset), muscle involvement spread following a caudo-cranial pattern. The late disease stage evokes the final amyotrophic lateral sclerosis (ALS) stage.

HSJ1 is a member of the HSP40/DNAJ co-chaperone family. Previous studies have presented *in vitro* data to show that HSJ1 prevented aggregation of not only a SOD1 mutant protein, which is related to ALS,[1] but also of a Parkin mutant protein associated with Parkinson's disease.[4] One of our patients developed YOPD and another fronto-temporal dementia. While preparing this paper, Parkinsonism and cerebellar ataxia has been described in a Brazilian family with the *HSJ1* c.352+1G>A mutation.[5] All these facts could suggest that the HSJ1 protein plays a protective role in neuronal groups of the central nervous system. However, these findings may be co-incidental, so functional studies or larger case series are needed to support this hypothesis.

**Acknowledgments:** The authors thank patients for having collaborated with this study. We are grateful to Itziar Llopis for sample management and Marisa Barreiro for technical assistance.

**Competing interests:** None

**Study funding:** This collaborative joint project is awarded by IRDiRC and funded by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)- Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación within the framework of the National R+D+I Plan [Grants no IR11/TREAT-CMT to TS, CM, FP and C.E; PI12/0946 to TS], the Fundación para la Investigación del Hospital Universitario La Fe [2015/0085, PI TS]. The Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER) is an initiative from the ISCIII.

**M. Frasquet** received a grant by Instituto de Investigación La Fe (2015/0085, PI TS). **C. Márquez (CM)** is funded by IRDiRC grant (IR11/TREAT-CMT). **F. Palau (FP)** is funded by IRDiRC grant (IR11/TREAT-CMT). **JF. Vázquez-Costa** is funded by Instituto de Investigación La Fe grant (2013/0332). **C. Espinós (CE)** is funded by grants from the ISCIII (CP114/00002 and PI12/00453) and IRDiRC (IR11/TREAT-CMT). Dr. Espinós has a “Miguel Servet” contract funded by the ISCIII and the Research Centre Príncipe Felipe (CIPF). **T. Sevilla (TS)** is funded by grants from the ISCIII and IRDiRC (IR11/TREAT-CMT and PI12/0946).

## REFERENCES

- 1 Blumen SC, Astord S, Robin V, et al. A rare recessive distal hereditary motor neuropathy with HSJ1 chaperone mutation. *Ann Neurol* 2012;71:509-19.
- 2 Gess B, Auer-Grumbach M, Schirmacher A, et al. HSJ1- related hereditary neuropathies: novel mutations and extended clinical spectrum. *Neurology* 2014;83:1726-32
- 3 Sivera R, Sevilla T, Vílchez JJ, et al. Charcot-Marie-Tooth disease: genetic and clinical spectrum in a Spanish clinical series. *Neurology* 2013;81:1617-25
- 4 Rose JM, Novoselov SS, Robinson PA, Cheetham ME. Molecular chaperone-mediated rescue of mitophagy by a Parkin RING1 domain mutant. *Hum Mol Genet* 2011;20:16-27.
- 5 Teive HAG, Arruda WO, Scola RH, et al. Distal hereditary motor neuropathy with HSJ1 chaperone mutation, presenting with peripheral motor neuropathy, associated to Parkinsonism, and cerebellar ataxia. Case report [abstract]. *Mov Disord* 2015;30Suppl1:960

**Figure 1 (Online supplementary material).** Title: “Pedigrees of the families with the *HSJ1* c.352+1G>A mutation”

Legend: Pedigrees of (A) family 1; (B) family 2; (C) family 3; (D) family 4 and (E) family 5. The parents of the affected sibling of family 1 were consanguineous (second cousins).

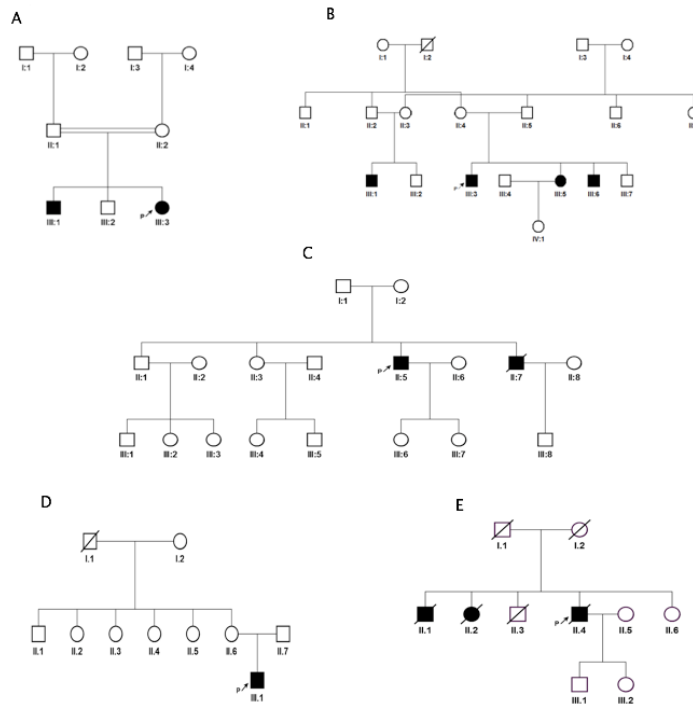
**Figure 2 (Online supplementary material).** Title: “Brain Magnetic Resonance Imaging (MRI) of patient F5/II-4”

Legend: T2/Flair coronal brain MRI of patient F5/II-4. MRI was performed at the age of 63 and showed asymmetrical cerebral atrophy affecting the right brain hemisphere.

**Table 2 (Online supplementary material).** Title: “Evolution of sensory nerve potentials

Legend: Normal values CSNAP: ulnar > 6.8  $\mu$ V; sural > 18  $\mu$ V; superficial peroneal nerve > 10  $\mu$ V; SCV = sensory conduction velocity; CSNAP = compound sensory nerve action potential; SP = superficial peroneal nerve; NA= not applicable; NP = not performed; NR = no response

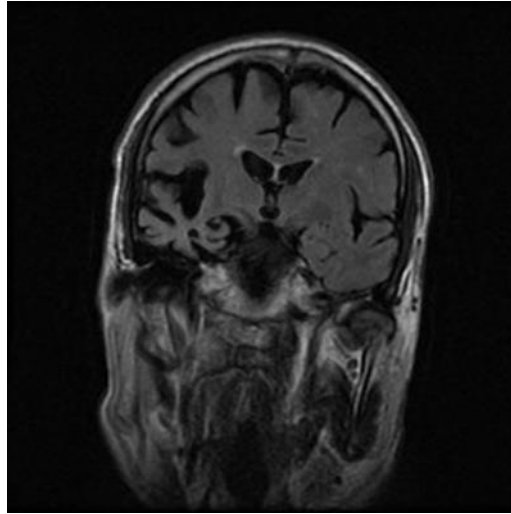
**Figure 1 (Online supplementary material): “Pedigrees of the families with the *HSJ1* c.352+1G>A mutation”**



Created by Paint X

Pedigrees of (A) family 1; (B) family 2; (C) family 3; (D) family 4 and (E) family 5. The parents of the affected siblings of family 1 were consanguineous (second cousins).

**Figure 2 (Online supplementary material): Brain Magnetic Resonance Imaging (MRI) of patient F5/II-4”**



T2/Flair coronal brain MRI of patient F5/II-4. MRI was performed at the age of 63 and showed asymmetrical cerebral atrophy affecting the right brain hemisphere



**Table 2. Evolution of sensory nerve potentials**

Family , Patient	Age	Sensory nerves					
		Sural nerve			Ulnar nerve		
		SCV, m/s	CSNAP, $\mu$ V	SCV, m/s	SCV, m/s	CSNAP, $\mu$ V	CSNAP, $\mu$ V
Family1, III-1	39	42.6	2.9		57.5	<b>10</b>	
Family1, III-1	50	NP	NP * SP	NR	52.3	<b>3.9</b>	
Family 1, III-3	29	44.5	<b>20</b>		66.4	<b>20</b>	
Family 1, III-3	32	44.1	<b>16</b>		59.0	<b>16</b>	
Family 1, III-3	40	45.8	<b>3.8</b>		62.2	<b>13</b>	
Family 2, III-1	20	46.6	4.3		50.0	7.6	
Family 2, III-1	35	45.5	3.2		58.5	7.0	
Family 2, III-3	15	57.6	NP	* SP	NP	NP	
Family 2, III-3	28	60.1	<b>8.3</b>	* SP	58.6	10.0	
Family 2, III-5	22	44.3	26.4		56.7	15.6	
Family 2, III-5	27	49.5	26.0		62.6	15.0	
Family 2, III-6	22	46.2	32		56.4	17	
Family 3, II-5	37	NA	<b>4</b>		NP	NP	
Family 3, II-5	52	NR	NR		28.0	4.0	
Family 3, II-7	31	NR	NR		ND	ND	
Family 4, III-1	24	48.3	5.5		NP	NP	
Family 4, III-1	29	46.7	5.0		56.1	16.9	
Family 5, II-4	63	NR	NR		NR	NR	

Normal values CSNAP: ulnar > 6.8  $\mu$ V; sural > 18  $\mu$ V; superficial peroneal nerve > 10  $\mu$ V; SCV = sensory conduction velocity; CSNAP = compound sensory nerve action potential; SP = superficial peroneal nerve; NA= not applicable; NP = not performed; NR = no response;

