

## Apéndice I

**Tabla Suplementaria 1.** Cebadores empleados para amplificar las regiones donde se encuentran los cambios candidatos para su validación

Probando	Gen	Cebadores	Secuencia 5' -> 3'	Temperatura de hibridación	Tamaño Amplicón
SGT-1752	SPAST	SPAST_E5_F*	CTTGTCTTTATGTTTCAGCTACAATT	59°C	461pb
		SPAST_E5_R*	AGGCGGAGGTTGCAAT		
SGT-1753	KIF1A	KIF1A_E37_F	CCACCAGGTGTGAGCCTCT	59°C	375pb
		KIF1A_E37_R	CCAGGTCCAAGGCTCTCCT		
	SLC6A19	SLC6A19_E11_F	GCTGGTAGCAGCAGTGAC	59°C	402pb
		SLC6A19_E11_R	GGTGTGACACATTGGTGTC		
SGT-1754	KIF5A	KIF5A_E25_F	GCAACTCAGTTCAACCCCA	60°C	381pb
		KIF5A_E25_R	CTAATCATAGGCATGAAGTTGAG		
	BSCL2	BSCL2_E11/12_F	CTCCTTCAGTGTCTGGGTC	57°C	489pb
		BSCL2_E11/12_R	GAACCCATTTTCAGAGTCAAGG		
SGT-1755	COL6A3	COL6A3_E10_F	AGGTTGATTAGGATTATGGTGC	57°C	751pb
		COL6A3_E10_R	GTTGATGTCACACTCTGTAGTCAT		
SGT-1756	SAMD9L	SAMD9L_E5_F	CATTAATGGAAGCTTTACAGAAT	55°C	472pb
		SAMD9L_E5_R	GTGAGCTGAAGAATCTGGATAG		
SGT-1757	KIF26B_1	KIF26B_E12_F	GCCCTACAGCAAGATCACGCC	60°C	412pb
		KIF26B_E12_R	AGTTCGCCACCTGCAAGGA		
	SLC33A1	SLC33A1_E5_F	ATACCATGAAAATTAATTTTCAGGT	55°C	504pb
		SLC33A1_E5_R	TGCTGATTTGAATGATTATAACC		
MD-483	ADCY5	ADCY5_E1_F2	TGTACCAGCGCTACTTCTTC	59°C	342pb
		ADCY5_E1_R2	GCAGCGTGTAGATGGTGTAG		
MD-484	KIF26B_2	KIF26B_E12_F2	AACATCCAAGAGCCGGAG	61°C	406pb
		KIF26B_E12_R2	GAAGGCTGCTGGACTTGAC		
	ATAD3A	ATAD3A_E6_F	CTTAGCCTGTCAGCAGTGTG	61°C	563pb
		ATAD3A_E6_R	CAGGAAGGACACGAAGATC		
MD-485	SPG7	SPG/E11-d*	GTTGGCCAGACTGCCCACTTCAG	65°C	626pb
		SPG/E11-R*	ACACATCAGCTCCCTCCCAGGCTT		
	TTR	TTR/E4-d*	ATGTGTGTCATCTGTCACG	55°C	224pb
		TTR/E4-r*	TTACATGAAATCCCATCCC		
	SETX	SETX/E4-d*	GAAAAGGCTTTCTAGGTCG	55°C	379pb
		SETX/E4-r*	AATTTGCAATATAGATAAGCC		
	FTL	FTL_E1_F	GCAGATTGGCCGCTAG	60°C	429pb
		FTL_E1_R	GCAGCTGGAGGAAATTAGG		
MD-486	MME	MME/E2-D*	CCACATTAAGCATTTGGACA	58°C	315pb
		MME/E2-R*	AGATGGTAAAAGCATGGAGG		
	KMT2D	KMT2D_E28_F	GACTCCTGCAGCACTTC	61°C	463pb
		KMT2D_E28_R	AGACTTGGCAGGCGACTC		
MD-487	FAT1	FAT1_E10_F1	AATATCTTGTTACAGTGGTTGC	57°C	383pb
		FAT1_E10_R1	GATGTCTGCTACTATGATGTCC		
		FAT1_E10_F2	GGTCACGTTACTTACCATATTG	57°C	467pb
		FAT1_E10_R2	GACCCATTATCCACAGCTC		
	CACNA1A	CACNA1A_E21_F	GCTATACAAGGGTTCAGTGATG	59°C	453pb
		CACNA1A_E21_R	TGACTTACGGAAGGAGCATC		
ATXN7	ATXN7_E7_F	TTCTCACTTCCTCTGTGA	57°C	378pb	

		ATXN7_E7_R	GGAATTCTAGATTGCAGTTGAT		
MD-502	KIF5A	KIF5A_E20_F	AGGAGACACATGGAATAACG	59°C	542pb
		KIF5A_E20_R2	AACCTCCTTCCATACTGGTG		
MD-504	SYNE1	SYNE1_E129_F	TGTGTGAAGTTGCATTATCCAG	62°C	477pb
		SYNE1_E129_R	GCCACCTTCTGTACCTGTGA		
		SYNE1_E72_D	AACTACCCTGTGAGTTGCAC	57°C	421pb
		SYNE1_E72_R	CGGACTAATACAGACCTGATTC		
MD-505	TENM4	TENM4_E28_F	CTGGAGACGATGGTTATGC	59°C	411pb
		TENM4_E28_R	CTCTTGAGTGCACCTGTTGG		
	CCDC88C	CCDC88C_E15_F	AGGTAGGACAGCCGTTCAAG	59°C	509pb
		CCDC88C_E15_R	CACGTTCTGCAAGGTGTCC		

\*Estos cebadores estaban en la base de datos del Laboratorio de Enfermedades Raras Neurodegenerativas del CIPF

**Tabla Suplementaria 2.** Programa general de PCR empleado para la amplificación de los genes candidatos

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	95°C	5min	1
Desnaturalización	95°C	30s	35
Hibridación	*	30s	
Extensión	72°C	30s**	
Extensión	72°C	7min	1
Reposo	4°C	∞	1

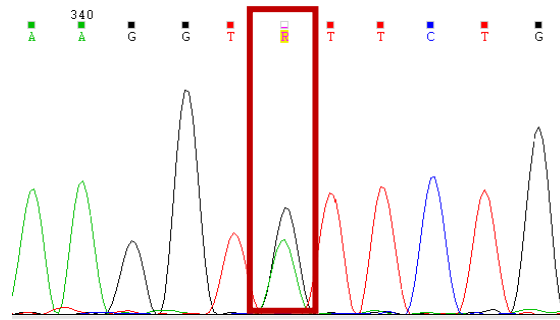
\*La temperatura de hibridación depende de los *primers* empleados. \*\*En el caso de *SPG7* y *COL6A3* la extensión fue de 40s y 45s, respectivamente.

**Tabla Suplementaria 3.** Cantidades estándar de los reactivos de la mezcla (25 µL) para PCR por muestra

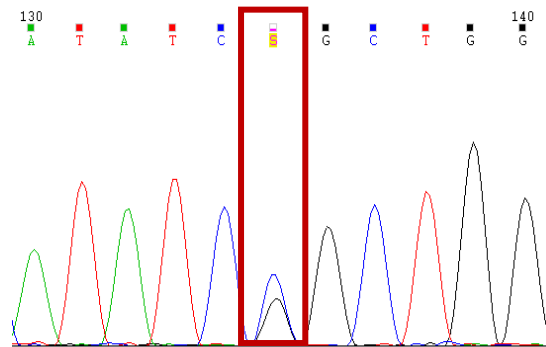
Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen	Empresa suministradora
H <sub>2</sub> O RNasa/DNasa Free	-	-	19,5µL	Invitrogen
Standard Reaction Buffer with MgCl <sub>2</sub>	10x	1x	2,5µL	Thermo Fisher Scientific
dNTPs	20mM	0,4mM	0,5µL	IBIANLab Technologies
<i>Primer</i> directo	10µM	0,2mM	0,5µL	Integrated DNA Technologies
<i>Primer</i> reverso	10µM	0,2mM	0,5µL	Integrated DNA Technologies
Taq DNA polymerase	1U/µL	0,02U/µL	0,5µL	Thermo Fisher Scientific
DNA**	50ng/µL	2ng/µL	1 µL	-

\*En el caso de *KIF26B\_1* y *ADCY5*, se añadieron 1µL MgCl<sub>2</sub> (25mM) (Thermo Fisher Scientific) y 1,25µL DMSO (Sigma-Aldrich), siendo el volumen de agua añadido 17,25µL. En el caso de *SPG7* y *CACNA1A*, se añadió 1,25µL DMSO, siendo el volumen de agua añadido 18,25µL. \*\*En el caso de las PCR de colonia se trata de picar una colonia y depositarla en la mezcla.

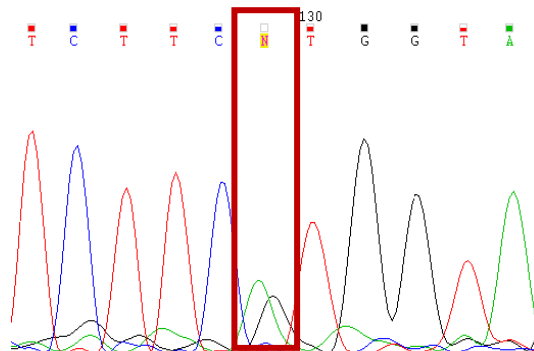
## Apéndice II



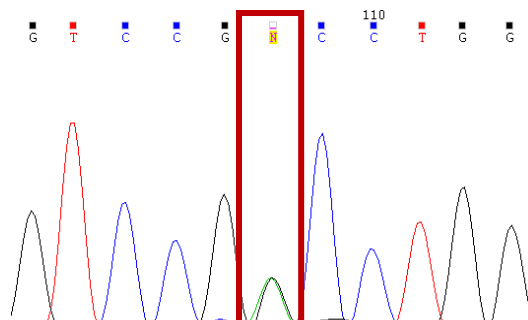
**Fig. Suplementaria 1.** Electroferograma de la validación del cambio *SPAST* c.870+3A>G en el probando SGT-1752 en heterocigosis.



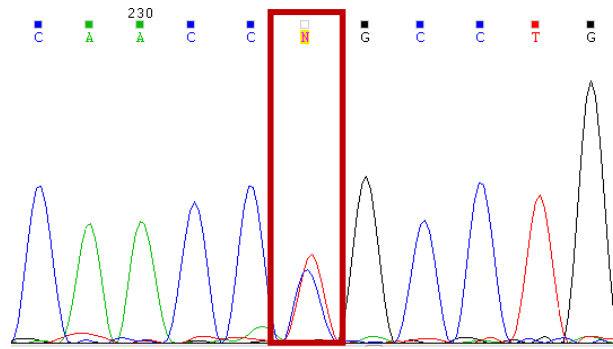
**Fig. Suplementaria 2.** Electroferograma de la validación del cambio *KIF1A* c.3871C>G en el probando SGT-1753 en heterocigosis.



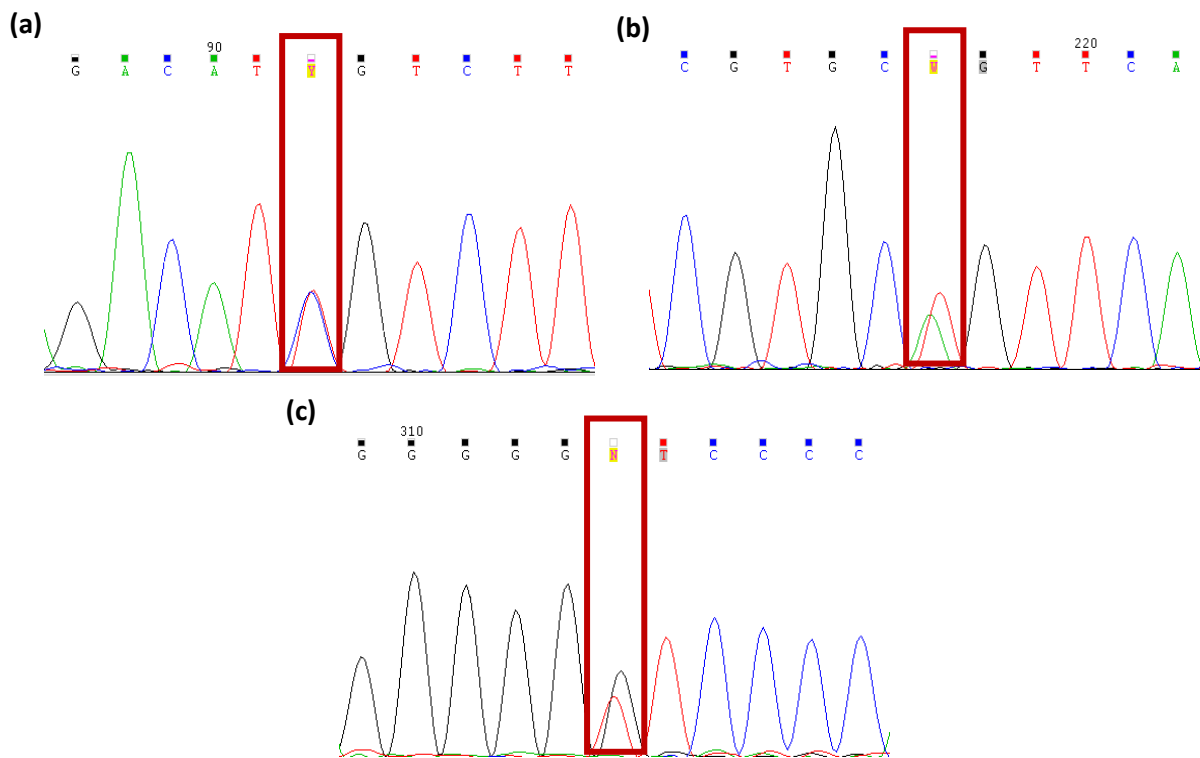
**Fig. Suplementaria 3.** Electroferograma de la validación del cambio *SLC6A19* c.1651G>A en el probando SGT-1753 en heterocigosis.



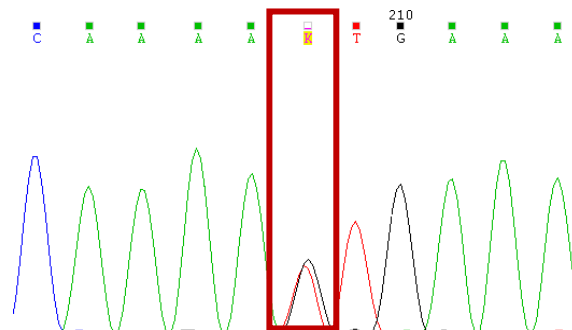
**Fig. Suplementaria 4.** Electroferograma de la validación del cambio *KIF5A* c.2769G>A en el probando SGT-1754 en heterocigosis.



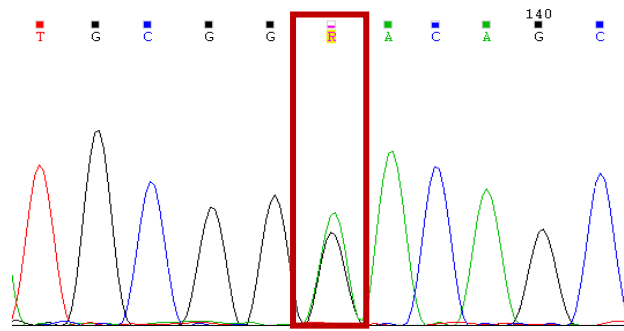
**Fig. Suplementaria 5.** Electroferograma de la validación del cambio *BSCL2* c.1280T>C en el probando SGT-1754 en heterocigosis.



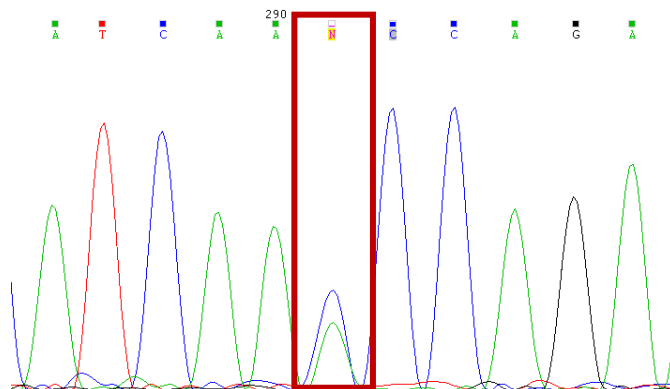
**Fig. Suplementaria 6.** Electroferograma de la validación los cambios (a) c.4311T>C, (b) c.4436A>T y (c) c.4533G>T en el gen *COL6A3* en el probando SGT-1755, todos ellos en heterocigosis.



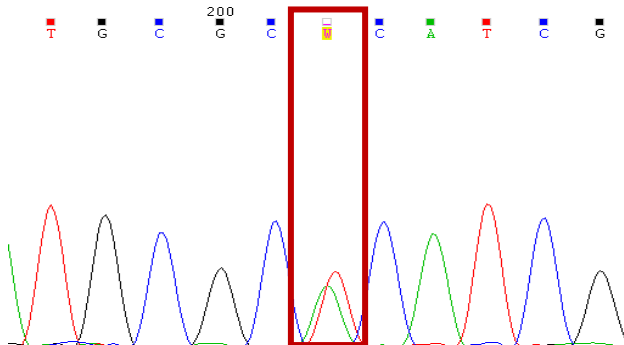
**Fig. Suplementaria 7.** Electroferograma de la validación del cambio *SAMD9L* c.3386G>T en el probando SGT-1756 en heterocigosis.



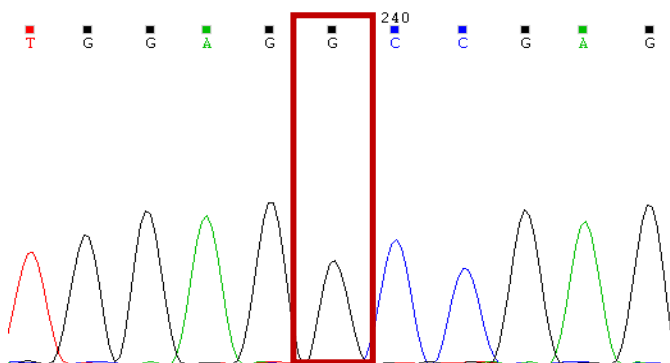
**Fig. Suplementaria 8.** Electroferograma de la validación del cambio *KIF26B* c.571G>A en el probando SGT-1757 en heterocigosis.



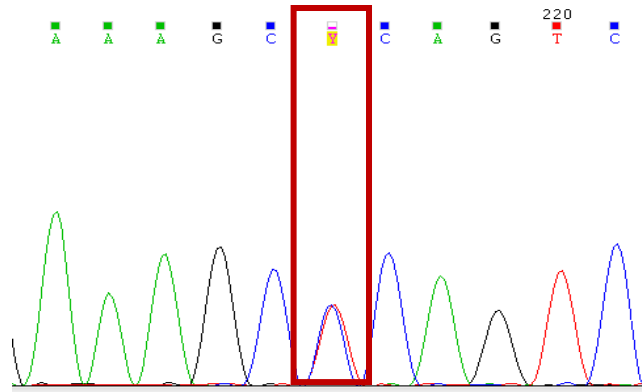
**Fig. Suplementaria 9.** Electroferograma de la validación del cambio *SLC33A1* c.1451A>C en el probando SGT-1757 en heterocigosis.



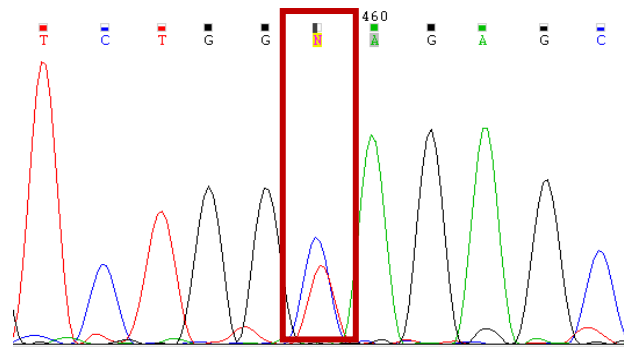
**Fig. Suplementaria 10.** Electroferograma de la validación del cambio *ADCY5* c.914T>A en el probando MD-483 en heterocigosis.



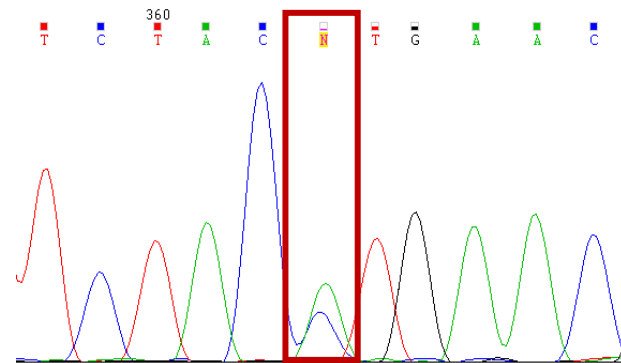
**Fig. Suplementaria 11.** El electroferograma muestra que el cambio el cambio *ATAD3A* c.715G>A no está en el probando MD-484, tratándose, por tanto, de un artefacto de la técnica de secuenciación.



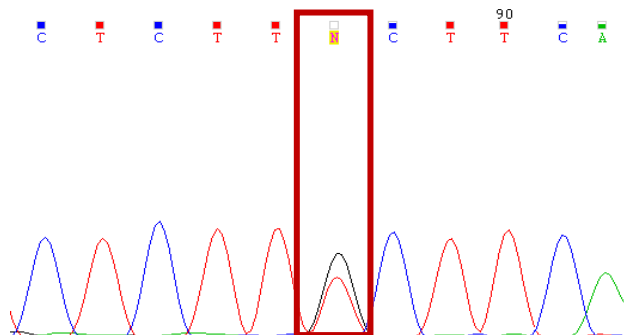
**Fig. Suplementaria 12.** Electroferograma de la validación del cambio *KIF26B* c.4451C>T en el probando MD-484 en heterocigosis.



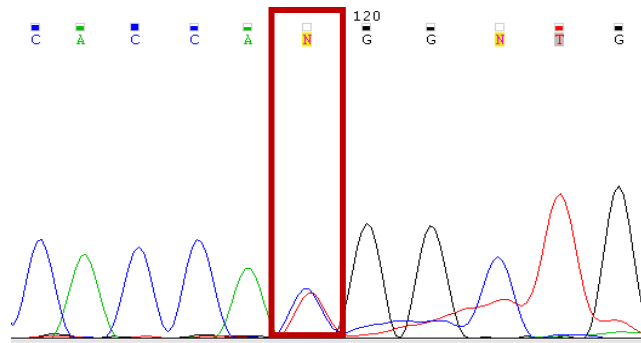
**Fig. Suplementaria 13.** Electroferograma de la validación del cambio *SPG7* c.1529C>T en el probando MD-485 en heterocigosis.



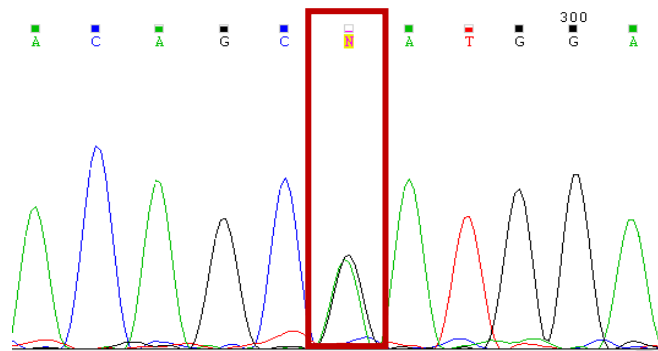
**Fig. Suplementaria 14.** Electroferograma de la validación del cambio *SETX* c.377A>C en el probando MD-485 en heterocigosis.



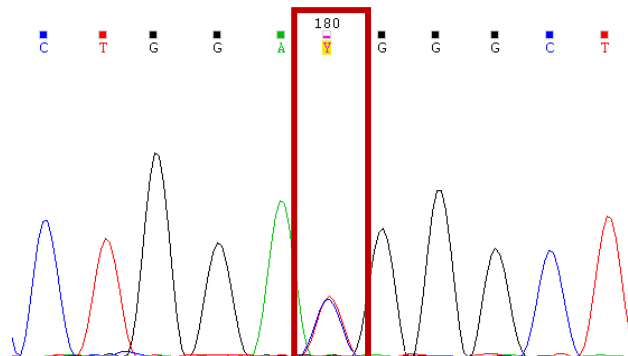
**Fig. Suplementaria 15.** Electroferograma de la validación del cambio *FTL* c.-168G>T en el probando MD-485 en heterocigosis.



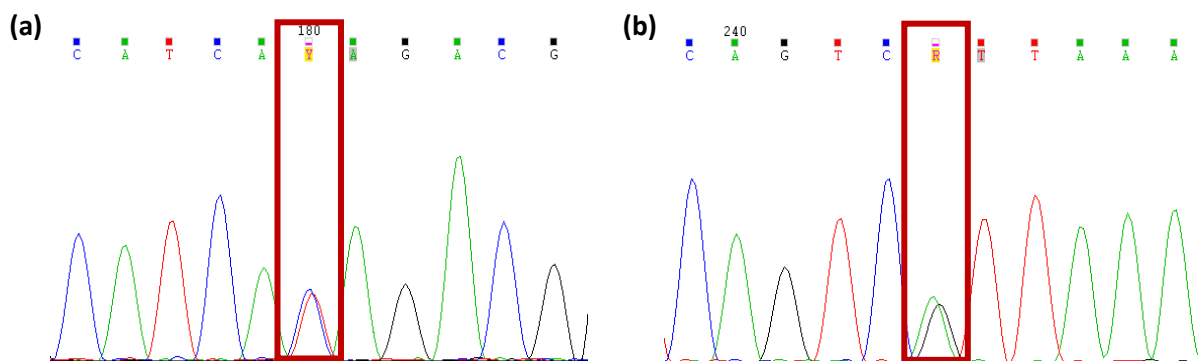
**Fig. Suplementaria 16.** Electroferograma de la validación del cambio *TTR* c.416C>T en el probando MD-485 en heterocigosis.



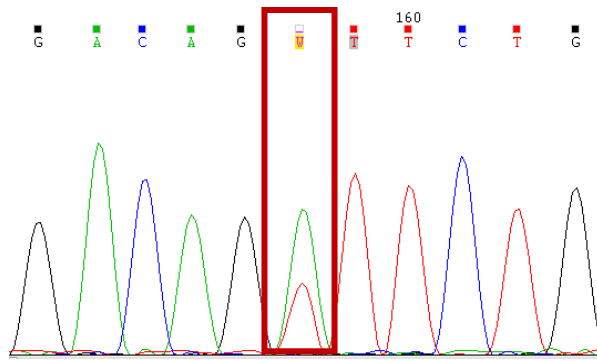
**Fig. Suplementaria 17.** Electroferograma de la validación del cambio *MME* c.68G>A en el probando MD-486 en heterocigosis.



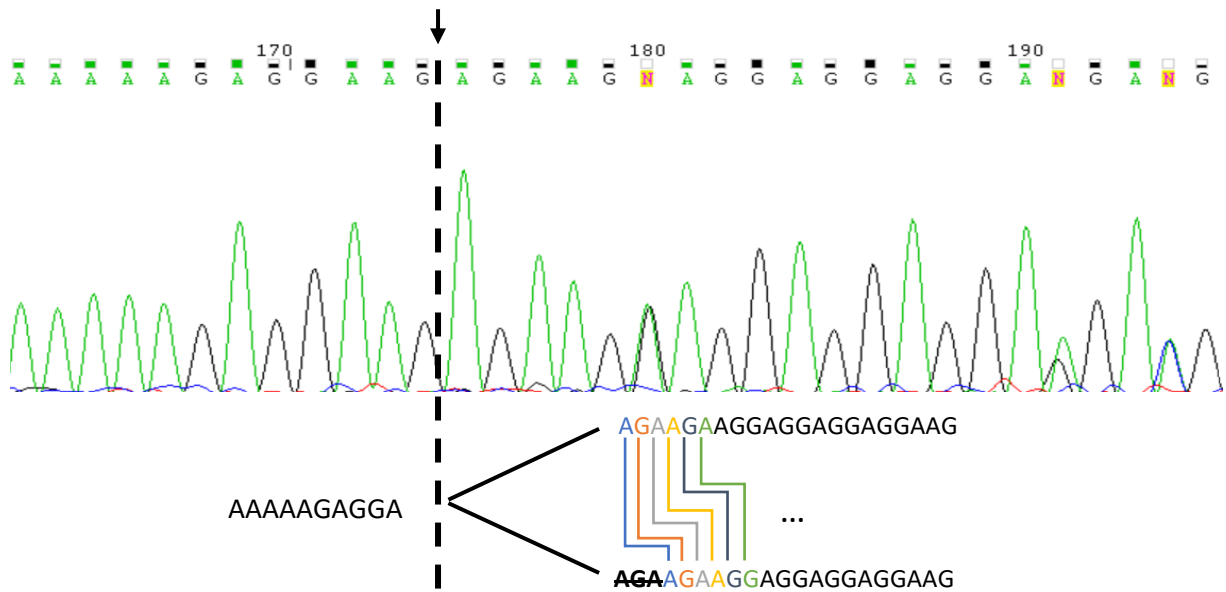
**Fig. Suplementaria 18.** Electroferograma de la validación del cambio *KMT2D* c.5921C>T en el probando MD-486 en heterocigosis.



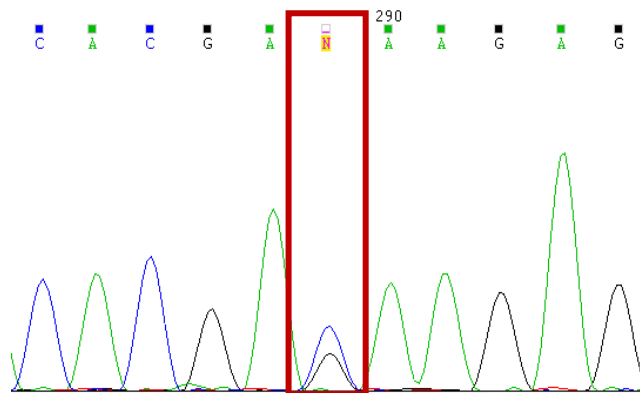
**Fig. Suplementaria 19.** Electroferograma de la validación los cambios (a) c.6656C>T y (b) c.7846G>A en el gen *FAT1* en el probando MD-487, ambos en heterocigosis.



**Fig. Suplementaria 20.** Electroferograma de la validación del cambio *ATXN7* c.916A>T en el probando MD-487 en heterocigosis.

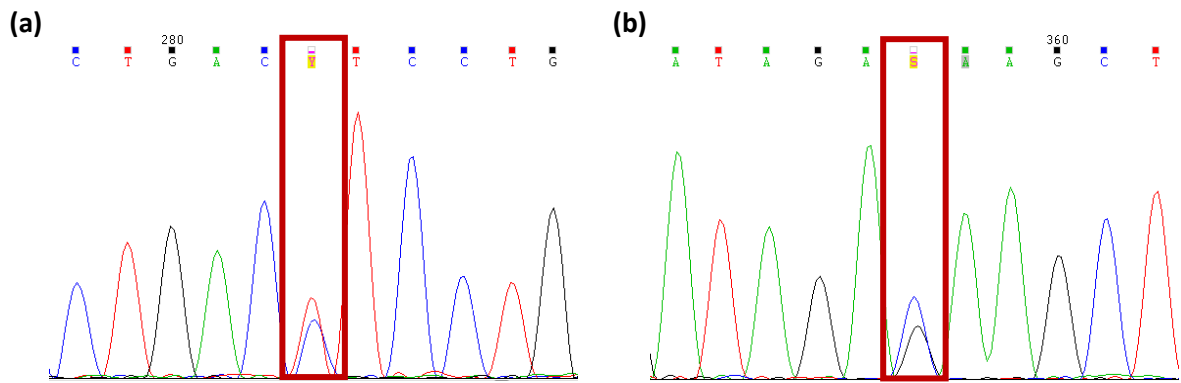


**Fig. Suplementaria 21.** El electroferograma muestra un heterodúplex formado como consecuencia del solapamiento de dos alelos, uno de los cuales presenta la deleción c.3599\_3601delAGA. El análisis manual de ambas pautas de lectura ha permitido identificar la deleción y el punto en que comienza la superposición de ambas secuencias (marcado con una línea discontinua). Se confirma la presencia de la deleción c.3599\_3601delAGA en el gen *CACNA1A* en el probando MD-487 en heterocigosis.

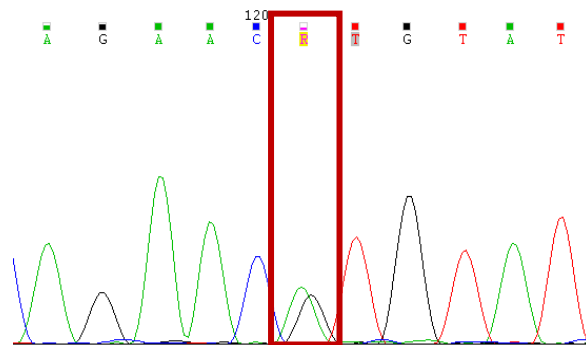


**Fig. Suplementaria 22.** Electroferograma de la validación del cambio *KIF5A* c.2274G>C en el probando MD-502 en heterocigosis.

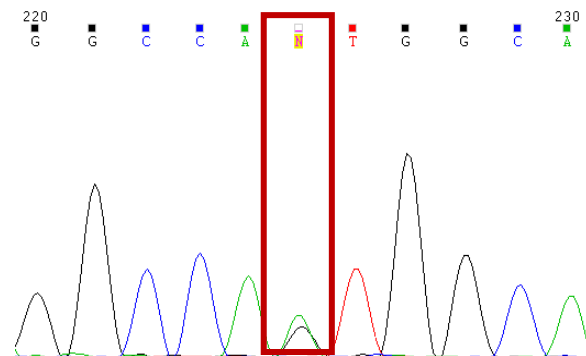




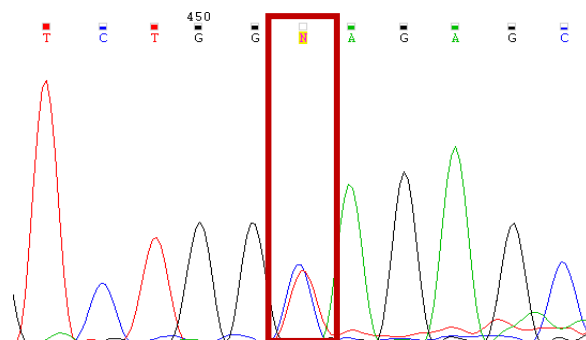
**Fig. Suplementaria 23.** Electroferograma de la validación los cambios (a) c.11848C>T y (b) c.23448G>C en el gen *SYNE1* en el probando MD-504, ambos en heterocigosis.



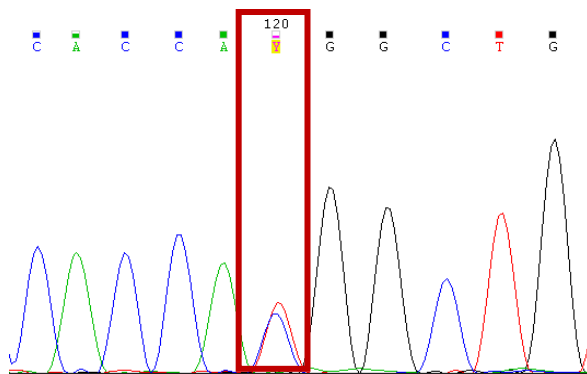
**Fig. Suplementaria 24.** Electroferograma de la validación del cambio *TENM4* c.4723A>G en el probando MD-505 en heterocigosis.



**Fig. Suplementaria 25.** Electroferograma de la validación del cambio *CCDC88C* c.1808A>G en el probando MD-505 en heterocigosis.



**Fig. Suplementaria 26.** Electroferograma de la validación del cambio *SPG7* c.1529C>T en el probando MD-514 en heterocigosis.



**Fig. Suplementaria 27.** Electroferograma de la validación del cambio *TTR* c.416C>T en el probando MD-514 en heterocigosis.

## Apéndice III

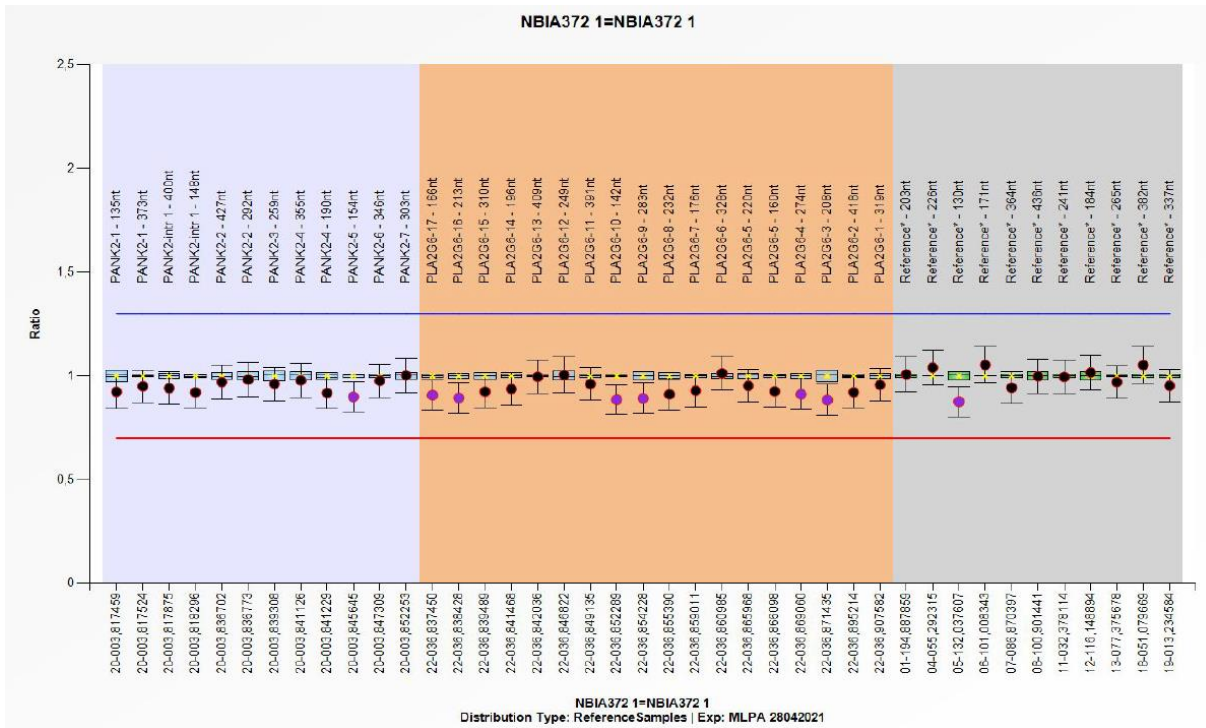


Fig. Suplementaria 28 Resultado de una de las réplicas del MPLA de *PANK2/PLA2G6* en el paciente NBIA-372

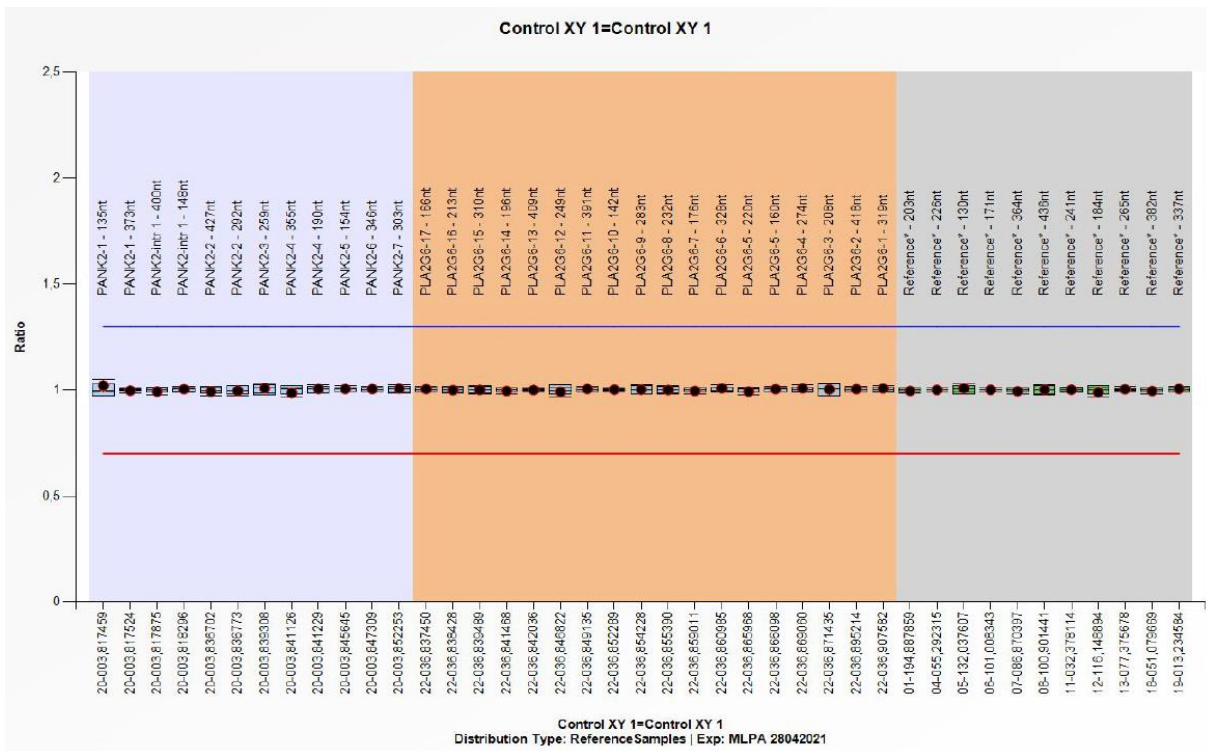


Fig. Suplementaria 29 Resultado de una de las réplicas del MPLA de *PANK2/PLA2G6* en el control XY