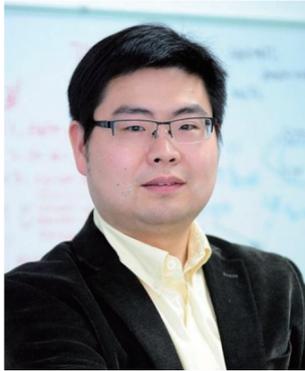


DOI: 10.13376/j.cblls/2017035

文章编号: 1004-0374(2017)03-0251-08



熊巍, 博士, 清华大学生命科学学院研究员, 国家优秀青年科学基金获得者, 致力于听觉的研究。耳蜗毛细胞是听觉产生的基础, 其主要功能是将声音导致的振动转导成细胞电位的变化, 并通过其带状突触将信息编码并上传到中枢神经系统, 然而毛细胞为实现这些重要功能所用到的分子组分以及相关机制还不是特别清楚。本实验室以基因改造小鼠为模型, 并通过正向和反向遗传学研究, 结合电生理和光学成像, 以鉴定更多与毛细胞功能相关的基因, 进一步阐明听觉产生的机制和遗传性耳聋的致病机理。

遗传性耳聋的生物学机制和治疗

刘 恋, 李 杰, 宋晨萌, 陈姣凤, 胡 群, 熊 巍*

(清华大学生命科学学院, 清华麦戈文脑科学研究院, 北京 100084)

摘 要: 遗传突变是人类疾病的主要原因, 其生物学机制是在基因层面的一些突变直接导致了特定组织器官的特定生物学过程的障碍。现以遗传性耳聋疾病为范式, 介绍近年来该领域内的基础研究方面的重要进展, 以及在临床转化方向的探索。

关键词: 遗传性耳聋; 耳蜗; 听觉毛细胞; 机械传导; 生物治疗

中图分类号: R764.43 **文献标志码:** A

Biological mechanisms and therapies of hereditary deafness

LIU Lian, LI Jie, SONG Chen-Meng, CHEN Jiao-Feng, HU Qun, XIONG Wei*

(School of Life Sciences, IDG/McGovern Institute for Brain Research at Tsinghua, Beijing 100084, China)

Abstract: Genetic mutation is a major cause of human diseases. The underlying biological mechanisms are recognized as the mutagenesis at genomic level directly disrupts specific biological pathway within the context of certain organ or tissue function. In this review, using hereditary hearing impairment as a model, we introduce current exciting advances in basic research and the biological therapies for potential clinical translation.

Key words: hereditary deafness; auditory hair cell; mechanotransduction; biological therapy

听力损失 (hearing loss) 和耳聋 (deafness) 是一种相当普遍的感觉类疾病, 严重影响到受影响人群的生活质量。根据世界卫生组织 (WHO) 的统计, 全球有大约 3.6 亿人有听力问题, 占总人口的 5%^[1]; 根据美国耳聋和交流障碍研究所 (NIDCD) 的统计, 在美国^[2], 每 1 000 个新生儿里就有 2~3 个有听力问题, 15% 的成年人有一定程度的听力损失; 中国的相关统计数据较少, 最近的一个统计数据是, 根

据 2006 年全国第二次残疾人抽样普查的结果, 中国听力残疾人数为 2 000 多万^[3] (这个数字应该是被低估的, 同时也说明我国对这方面的数据研究还

收稿日期: 2016-04-07

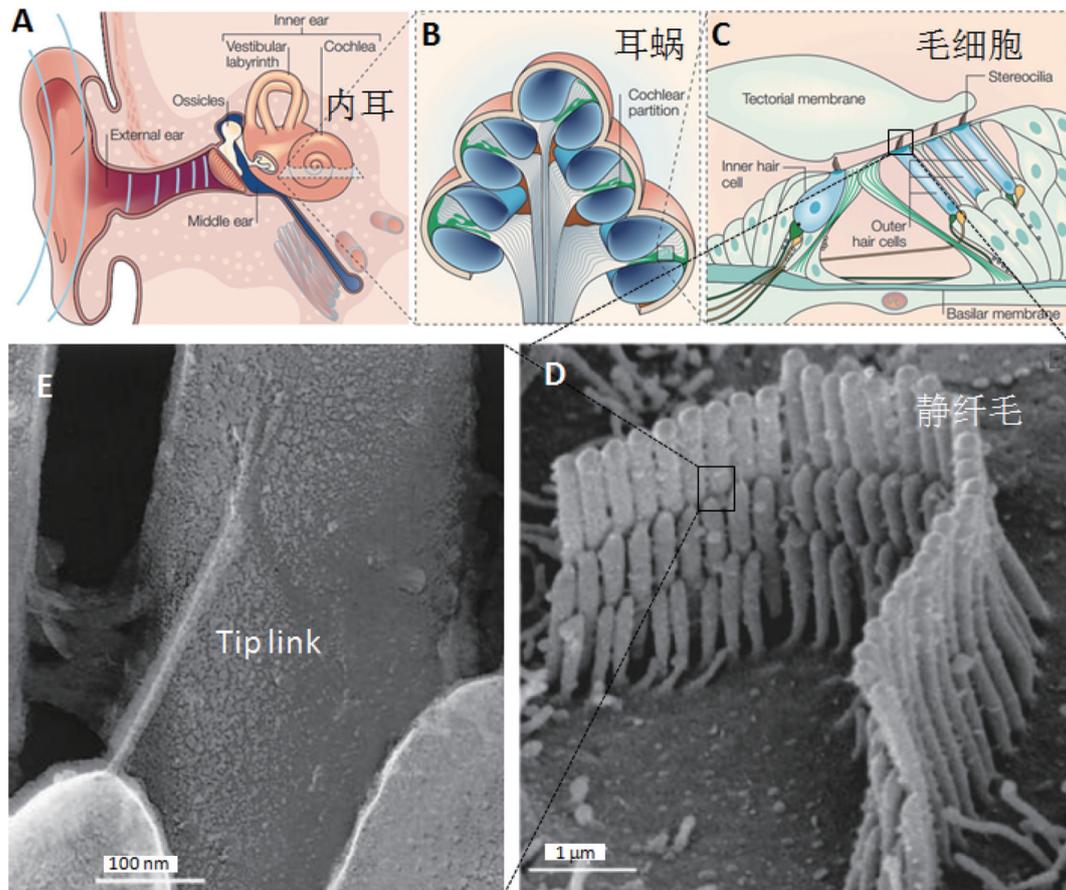
基金项目: 国家自然科学基金优秀青年科学基金项目 (31522025); 国家自然科学基金项目 (31571080)

*通信作者: E-mail: wei_xiong@tsinghua.edu.cn

有值得深入挖掘的地方)。人正常的听力阈值在 25 分贝以下, 如果听力显著高于这一阈值, 称之为听力损失; 耳聋是指目标人群基本上听不见外界声音, 必须依赖于辅助设备的帮助获得听力, 使用哑语来进行交流。为了方便写作, 下面统称为听力疾病 (hearing impairment)。听力疾病问题不仅会给受影响个体造成个人情感上的影响, 如会导致孤独感和挫折感, 还直接影响到他们在社会中的融入程度, 如耳聋儿童的高失学率和耳聋成年人的高失业率, 给家庭和社会带来沉重的经济负担。

听觉对人们的日常生活如此重要, 以至于它必不可少, 典型的应用体现在: 人们对日常生活中潜在危险的判断, 例如知道避开一部从背后驶近的汽车; 更重要的是, 人们在社会中的日常交流是基于听说的, 包括对音乐的欣赏。人耳对于声音信号的采集有着相当强的能力, 首先是很大的动态响应范围, 从风吹树叶的摩挲 (10 分贝) 到飞机飞过的轰鸣声 (80 分贝), 其能量差别有 10^7 之巨; 其次是准

确的频率分辨力, 人可以听到 20 赫兹到 20 000 赫兹的声音; 还有极快的时间分辨力, 可以精确到微秒级的捕捉; 最后是空间分辨力, 通过比对双耳采集的信号, 可以知道声源来自何方。而要实现对外界声音信号的这些精准感觉, 有赖于人耳这个精巧的生物学结构 (图 1^[4-5])。人耳主要分为外耳、中耳和内耳, 外耳就像天线一样把声音信息收集下来, 通过中耳的能量匹配功能, 将声音参数以合适的能量级别传给内耳。作为人体最为精巧复杂的器官之一, 内耳里的螺旋器 (也称之为柯蒂氏器, organ of Corti) 就是解析声音参数的生物机器, 螺旋器由盖膜 (tectorial membrane)、听觉毛细胞 (auditory hair cells) 和支持细胞 (supporting cells) 以及基底膜 (basilar membrane) 组成, 其中毛细胞是特化的将声音振动换能成生物电信号的细胞。哺乳动物的听觉系统相较于低等脊椎动物在进化上有了一个质的飞跃, 在解剖结构上以螺旋器的方式将整个关键听觉感受细胞群体压缩到一个紧凑的三维空间 (人的内耳直径



A~C显示为人耳, D、E为小鼠。图片改编自[4-5]。

图1 哺乳动物耳从宏观到微观的结构

约 9 mm)。在基底膜上有一排内毛细胞和三排外毛细胞形成矩阵状的排列, 基底膜的主要功能是作为被动频率解析器, 外毛细胞主要起主动放大和调频的作用, 内毛细胞则是精准地将声音信息编码, 并传到中枢神经系统进行深度解析。

耳科学作为一个发展起步比较早的学科, 在 100 多年前就有诸多的科学家对其解剖学结构进行了详尽而细致的研究, 其后, 实现该结构和功能的生物学原理一直是大家非常感兴趣的一个方向。20 世纪下半叶以来, 随着神经生理学的发展, 研究者可以采用微探针电极, 记录螺旋器上毛细胞群体电位的变化, 甚至单个毛细胞的电活动, 从而可以让人们看到, 在形成听觉的过程中, 内耳中的不同细胞对声音信号的电位反应。自 2000 年以来, 以人类基因组计划圆满结束为标志的后基因组时代开始, 新兴的分子遗传学手段使人们对螺旋器组织实现听觉感受这一过程的分子基础有了更深刻的理解, 一些毛细胞特异性高表达的分子也相继被发现。例如 2000 年美国的 Dallos 实验室发现了 Prestin 蛋白, 它具有电致机械性, 是外毛细胞参与主动调制的重要分子, 从而首次为内毛细胞和外毛细胞功能不同的表型提供了分子级别的注解; 内毛细胞特异性表达的 Otoferrin 是一个钙结合蛋白, 目前已知的功能是特异性地调节内毛细胞的囊泡释放^[6-8], 从而将听觉产生的信息编码成动作电位, 上传到上一级的神经核团。

目前许多与听力问题相关的基因已经被发现, 已经确定的非综合征型的耳聋基因有 70 余个, 保守估计未来还有大约 300 个与听力疾病相关的基因有待鉴定^[9], 这些耳聋基因的发现将极大地推动人

们对听觉产生原理以及耳聋致病机理的进一步了解。由于篇幅有限, 本文将着重探讨近年来在基础和转化研究中各自最前沿的部分, 主要集中在两点: 第一个是毛细胞机械传导的分子机理; 第二个是对耳聋的治疗, 尤其是针对遗传性耳聋基因治疗的进展。

1 听觉毛细胞机械传导

首先, 机械传导这一生物学过程在进化上不保守, 从线虫到果蝇到脊椎动物, 涉及到的蛋白通道的分子成分都不太一样^[10]; 其次, 就听觉器官的组织结构而言, 也是随着动物的高等程度越来越精巧, 例如作为哺乳动物的高等脊椎动物就比低等脊椎动物的听觉器官发达。在这里主要讨论的是哺乳动物听觉毛细胞的机械传导, 尤其是以小鼠为模型的研究, 因为小鼠和人的听觉器官在解剖结构、生理功能以及分子基础上有着很好的相似性^[10-11]。利用小鼠这一优越的遗传学模型, 一系列深层次的听觉机制问题被陆续解决, 并能够为临床医学提供基础知识。

为了实现将声音产生的振动换能成细胞电信号, 外毛细胞和内毛细胞都需要利用一套机械-电换能装置。该装置由毛细胞顶端特化出一个亚细胞结构实现, 被称为毛束 (hair bundle), 其由上百根静纤毛 (stereocilia) 组成, 并排布成三排高低错落的阶梯状结构 (图 1)。现在越来越多的证据表明, 机械传导这一生物过程由一个蛋白复合体完成 (图 2)。首先, 在每一根静纤毛和邻近高他一头的静纤毛之间, 有一个称为顶链 (tip link) 的结构将两根静纤毛连在一起。顶链的作用就是将机械力传送到机械传

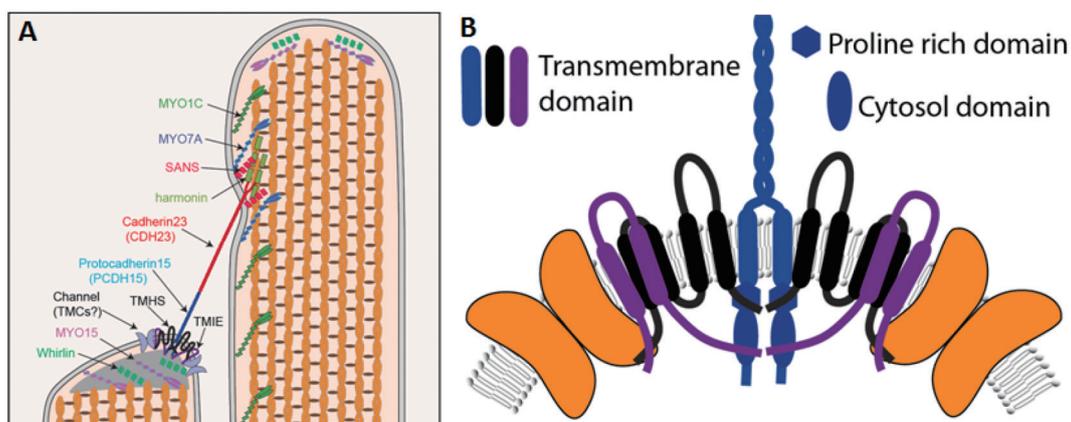


图2 毛细胞机械传导复合体的分子组成

导通道，从而产生机械电流^[12]。顶链本身由两个钙黏连蛋白非对称地组成^[13]，其上段是 CDH23 (Cadherin 23)^[14-16]，下端是 PCDH15 (Protocadherin 15)^[17]，顶链两端插入静纤毛膜内的部分与若干蛋白形成复合体，以上结构统称为机械传导复合体。在顶链上端有 harm-onin^[18-20]、Myosin7A^[21-23]、SANS^[24-26]等蛋白，在每根静纤毛的顶端特异性分布的蛋白有 Myosin15A^[27-28] 和 Whirlin^[29-30]。

早在 20 世纪 90 年代，大家就对机械传导通道在毛细胞上的表达位置进行了卓有成效的探讨，实时钙成像实验显示在毛束的顶端有一个离子通道^[31-32]。但是人们对于其微观分布还是局限于理论假设的状态，对机械通道复合体蛋白组成的鉴定一直止步不前，一个主要的原因是这个过程太过于复杂，同时缺乏比较有效的研究手段。2009 年，Anthony Ricci 和 Robert Fettiplace 实验室应用高速共聚焦钙成像的方法验证了机械传导通道只分布在顶链的下端，也就是 PCDH15 的插膜端，进一步说明机械传导复合体是一个不对称结构^[33]。近几年已经鉴定到 3 个参与该复合体的蛋白。TMHS 在 2005 年被报道，是一个四次跨膜蛋白，其突变导致严重耳聋^[34]。2012 年，作者的工作显示 TMHS 特异性地与 PCDH15 结合，继而促进其转运到静纤毛膜上，而且 TMHS 的缺失导致机械传导电流动力学发生改变，提示该蛋白是机械传导通道复合体中的重要组分^[35]。TMC 是一个六次跨膜蛋白，其致聋性最早被报道是 2002 年^[36-37]，当时其自发突变的耳聋小鼠被命名为贝多芬 (Beethoven)^[37]。电生理记录显示，这种幼年小鼠的毛细胞并没有机械传导电流的损失，然而在成年小鼠上有重度耳聋表型^[38]。因此，当时的推断是 TMC 可能是一个和发育相关的因子。而十年后也就是 2011 年研究发现，共敲除 TMC1 和 TMC2 可以导致机械电流的完全丧失，显示它们可能作为一个异聚体在机械传导通道复合体中起作用^[39]。TMIE 最早在 2002 年被报道^[40-41]。2014 年，本课题组进一步研究发现，TMIE 作为一个二次跨膜蛋白，也参与机械传导复合体，生化结果显示其可以和 PCDH15 结合；TMIE 的缺失直接导致机械电流的丧失，说明 TMIE 功能性地偶联 tip link 和机械传导通道^[42]。从目前已报道的数据来看，TMC 家族成员被认为是最有可能的机械传导通道的核心元件——孔道蛋白 (pore subunit)，例如其点突变导致了机械通道单通道电导的变化。但是还存在一些无法解释的问题。TMC1 在体外系统，例如在 HEK293 细胞系表

达后，并不能在细胞质膜上检测到明显分布，也无法赋予表达细胞机械敏感电流^[39]，尤其是最近又有一些新的观察显示了其未知性。已知如果机械传导复合体中的某一个蛋白缺失，例如 BAPTA 处理毛束导致顶链断裂或者 TMHS 基因被敲除，毛细胞会产生一个反向刺激毛束导致的机械传导电流，有意思的是，TMC1 和 TMC2 的双突变毛细胞上也有这种电流^[43-44]。一种解释是机械传导电流还存在，只是换了激活的方式；当然另一种可能的解释是毛细胞上有两种机械传导通道，该表型只是来自于第二种机械通道。因此，在最近几年，领域内对 TMC 功能的讨论相当热烈。

2 耳聋的生物治疗

导致耳聋的主要原因从致病来源上分的话，主要是遗传性因素（包括先天性和后天性）和环境因素（例如感染性聋、药物性聋、老年性聋和噪音性聋），其中遗传性聋的比例占到一半。随着医疗条件的改善，感染性聋和药物性聋已经有了比较好的预诊疗，患病人数显著减少；但随着社会经济的高速发展和生活节奏的加快，噪音性聋却有了明显增加。另外，随着我国人民群众生活条件的改善，居民老龄化比例提高，老年性耳聋的人数也随之增加，其实相当部分噪音性和老年性耳聋患者的致病因素里也有易感基因的影响，所以遗传性耳聋的比例其实是在增加的。因此，了解与耳功能相关的基因以及这些基因工作的机制，会对临床上针对耳聋疾病的个性化预诊疗方案提供极大的帮助。

由于人类基因组学的快速发展，目前新生儿听力检查已成为标准流程。新兴的临床诊断，如孕前、产前耳聋基因的突变筛查也可对耳聋幼儿做到早期发现、早期干预，这已成为转化医学的典型范例。目前对于已经预判耳聋的患者，主要是通过医学工程的方法，例如定制助听器 (hearing aid) 或者人工耳蜗 (cochlear implant) 的方式来挽救一些残存的听力，弥补语言能力。但是这些治疗手段还是有一定局限性：(1) 不是对所有的耳聋患者都能够有效，而且存在佩戴舒适性的问题；(2) 人工耳蜗的植入是以损伤螺旋器为代价的，会带来听觉毛细胞的永久消亡；(3) 医疗仪器的精确度有限，目前人工耳蜗能够做到多达 30 个通道，这个数量的通道已经可以满足患者分辨日常对话，但是还远远不能满足他们对于生活品质的追求，例如欣赏音乐等要求。因此，寻求生物学的办法来治疗或者缓解听力损失

也是研究者梦寐以求的研究方向, 令人兴奋的是当下生物治疗在实验动物中的研究已经初现曙光。

2.1 药物治疗

药物治疗因为其介入方式简单最受期待。一个比较成功的例子是 2013 年 Albert Edge 小组在噪声性耳聋小鼠上的实验。研究发现, 通过圆窗膜 (round window membrane) 给药的方式注射 γ -secretase 的抑制剂, 如 LY411575, 可以增加耳蜗毛细胞的数量, 并且提高噪音损伤动物的听觉。其机制是抑制 Notch, 从而使得噪音损伤诱导支持细胞分化成毛细胞; 但是, 听觉脑干电位反应 (auditory brainstem response, ABR) 等功能检测显示仅有低频部分的听力阈值略有改善, 高频段的听力可能因为新生毛细胞数量不足而未能获得提高^[45]。同年, Hastings 课题组通过腹腔注射反义寡核苷酸 (antisense oligonucleotides) 的方法, 实现了 Usher 综合征型 1C (Usher syndrome 1C) 耳聋小鼠模型一定程度的听力恢复。这例小鼠模型模拟了一类特殊的患者, 其致病原因是 *USH1C* 基因突变产生了一个隐秘的选择性剪切位点, 从而导致其编码的 Harmonin 蛋白被严重剪短, 进而影响毛细胞机械传导过程, 出现耳聋症状; 在实验动物上即使通过简单的腹腔注射也可以实现一定程度的前庭功能和听力的恢复, 不过这种治疗方案有介入时间上的限制, 主要在新生小鼠上有效^[46]。

2.2 干细胞治疗

早前人们就认识到毛细胞是由支持细胞分化而来, 鸟类的支持细胞一直保持可以再分化为毛细胞的能力, 但是在哺乳动物中该能力却丢失了。从 2000 年开始, 一些与毛细胞和支持细胞分化相关的转录因子陆续被报道。其中 *Atoh1* (也称为 *Math1*)

是最引人注目的一个, 其过表达可以直接引起毛细胞增殖^[47]; 敲除调节毛细胞退出细胞周期的 *Retinoblastoma* 蛋白 (Rb) 可以促进毛细胞增殖^[48]; 另外, 支持细胞特异性表达的蛋白 *P23kip1* 如果下调的话可使细胞重新进入细胞周期, 并可以部分地增加新生毛细胞的数量^[49]。同时, 干细胞分化成毛细胞的相关研究也有了突破性进展。Stefan Heller 小组 2003 年就从成年人的内耳球囊上皮组织中找到了多能干细胞^[50], 2010 年成功地利用胚胎干细胞和诱导多能干细胞分化出有机械传导功能的毛细胞^[51], 2012 年将人胚胎干细胞分化出来的耳前体细胞植入乌本昔致聋的小鼠内耳, 使其听力恢复^[52], 2013 年直接通过 3D 支架的帮助在体外诱导多能干细胞分化生成了含有机电传导功能毛细胞的耳泡^[53]。

2.3 基因治疗

目前直接向耳蜗导入基因的方式已经比较成熟, 可以实现某一种特定的突变基因导致的耳聋恢复, 且已有不少成功的例子。在体外培养的耳蜗组织中直接导入与机械通道复合体相关的蛋白可以恢复相应突变的功能。例如 *TMC1/2*、*TMHS*, 利用腺病毒 (adenovirus) 或者电转的方式感染突变小鼠的耳蜗毛细胞, 发现机械反应都有很大程度的恢复^[35, 39]。在体的尝试也有一定突破。研究者选用毛细胞突触囊泡特异性表达的谷氨酸转运体 3 (*vesicular glutamate transporter 3, VGLUT3*) 进行基因治疗, 其基因敲除小鼠是全聋的。借用 *AAV1* 将 *VGLUT3* 的基因导入该小鼠耳蜗毛细胞, 转染效率在新生小鼠 (P0-1) 上可以达到 100%。通过检测 ABR 反应以及惊跳反射 (startle reflex) 发现, 得到基因治疗的耳聋小鼠的听力在一定程度上得到恢复 (图 3), 并且可以维持几个月。这一在体小鼠基因治疗结果令人振奋, 也

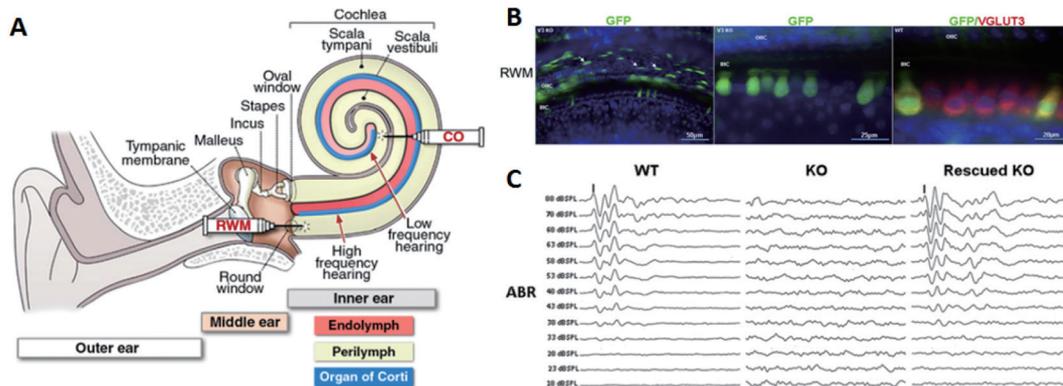


图3 遗传性耳聋的基因治疗^[54, 56]

是首次在活体动物中实现了整个听觉系统性的听力修复^[54]。但是大部分的尝试还是有一些未知问题的困扰。例如针对 *GJB2* 基因的治疗，该基因导致的耳聋病患占 40% 之多。*GJB2* 主要编码缝隙连接蛋白 Connexin 26，是内耳中电突触的重要组成部分，而电突触广泛存在于基底膜以及血管纹支持细胞网络中，形成电突触偶联 (gap-junction coupling)。*GJB2* 发生突变直接导致钾离子循环异常，无法维持耳蜗内电位 (endolymph potential)，致使机械电转换过程不能正常进行，从而产生耳聋。研究人员同样在 *GJB2* 基因敲除小鼠模型中利用 AAV 实现了耳蜗支持细胞 Connexin 26 的表达，并且检测到电突触偶联的恢复，遗憾的是被修复小鼠的 ABR 仍然异常^[55]。已有的数据提示，在体通过病毒介导的功能基因表达实现的听力恢复有一定的局限性，例如听觉功能未能在生理水平修复和恢复效果随着时间的消逝，这可能和过表达系统的毒性和易过性有关；另外病毒作为载体如果真正在人体使用，存在可能的伦理问题。

3 总结和展望

总体而言，人们对于听觉产生的生物学机制和耳聋的致病机理的理解正在逐步深入，正如前文所描述的，已经在分子、细胞、组织水平上对该生物过程有了越来越详尽的数据。对于听觉毛细胞的生理功能，尤其是对于毛细胞机械传导的生物学机制有了最新的认识，对于其核心元件的分子组分的鉴定也是指日可待。同时，这些基础研究的知识积累为针对耳聋疾病的临床治疗提供了坚实的基础，可以预计在不久的将来，通过多学科交叉结合，例如从生物医学工程到生物技术，应该可以实现对主要遗传性听觉疾病的生物医学治疗。尤其是当下基因组编辑技术的出现，例如 CRISPR/Cas9，使得从根源上更正导致疾病的基因突变成为可能，而且这方面的工作已经陆续有一些成功的案例报道。因此，采用基因治疗的方案来探索治疗以遗传性耳聋为代表的神经系统疾病非常值得推动。

[参 考 文 献]

[1] Zhao Q, Wu K, Geng J, et al. Ion permeation and mechanotransduction mechanisms of mechanosensitive Piezo channels. *Neuron*, 2016, 89: 1248-63

[2] National Institute on Deafness and Other Communication Disorders. Quick statistics about hearing [EB/OL]. <https://www.nidcd.nih.gov/health/statistics/quick-statistics->

hearing

[3] 第二次全国残疾人抽样调查领导小组, 中华人民共和国国家统计局. 2006年第二次全国残疾人抽样调查主要数据公报(第一号)[EB/OL]. (2006-12-01). http://www.gov.cn/fwxx/cjr/content_1311944.htm

[4] Frolenkov GI, Belyantseva IA, Friedman TB, et al. Genetic insights into the morphogenesis of inner ear hair cells. *Nat Rev Genet*, 2004, 5: 489-98

[5] Kachar B, Parakkal M, Kurc M, et al. High-resolution structure of hair-cell tip links. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 13336-41

[6] Dulon D, Safieddine S, Jones SM, et al. Otoferlin is critical for a highly sensitive and linear calcium-dependent exocytosis at vestibular hair cell ribbon synapses. *J Neurosci*, 2009, 29: 10474-87

[7] Roux I, Safieddine S, Nouvian R, et al. Otoferlin, defective in a human deafness form, is essential for exocytosis at the auditory ribbon synapse. *Cell*, 2006, 127: 277-89

[8] Yasunaga S, Grati M, Cohen-Salmon M, et al. A mutation in *OTOF*, encoding otoferlin, a FER-1-like protein, causes DFNB9, a nonsyndromic form of deafness. *Nat Genet*, 1999, 21: 363-9

[9] Shearer AE, Smith RJ. Genetics: advances in genetic testing for deafness. *Curr Opin Pediatr*, 2012, 24: 679-86

[10] Gillespie PG, Walker RG. Molecular basis of mechanosensory transduction. *Nature*, 2001, 413: 194-202

[11] Kelley MW. Regulation of cell fate in the sensory epithelia of the inner ear. *Nat Rev Neurosci*, 2006, 7: 837-49

[12] Corey DP, Hudspeth AJ. Analysis of the microphonic potential of the bullfrog's sacculus. *J Neurosci*, 1983, 3: 942-61

[13] Kazmierczak P, Sakaguchi H, Tokita J, et al. Cadherin 23 and protocadherin 15 interact to form tip-link filaments in sensory hair cells. *Nature*, 2007, 449: 87-91

[14] Bolz H, von Brederlow B, Ramirez A, et al. Mutation of *CDH23*, encoding a new member of the cadherin gene family, causes Usher syndrome type 1D. *Nat Genet*, 2001, 27: 108-12

[15] Siemens J, Lillo C, Dumont RA, et al. Cadherin 23 is a component of the tip link in hair-cell stereocilia. *Nature*, 2004, 428: 950-5

[16] Sollner C, Rauch GJ, Siemens J, et al. Mutations in cadherin 23 affect tip links in zebrafish sensory hair cells. *Nature*, 2004, 428: 955-9

[17] Alagramam KN, Murcia CL, Kwon HY, et al. The mouse Ames waltzer hearing-loss mutant is caused by mutation of *Pcdh15*, a novel protocadherin gene. *Nat Genet*, 2001, 27: 99-102

[18] Grillet N, Xiong W, Reynolds A, et al. Harmonin mutations cause mechanotransduction defects in cochlear hair cells. *Neuron*, 2009, 62: 375-87

[19] Verpy E, Leibovici M, Zwaenepoel I, et al. A defect in harmonin, a PDZ domain-containing protein expressed in the inner ear sensory hair cells, underlies Usher syndrome type 1C. *Nat Genet*, 2000, 26: 51-5

[20] Bitner-Glindzicz M, Lindley KJ, Rutland P, et al. A

- recessive contiguous gene deletion causing infantile hyperinsulinism, enteropathy and deafness identifies the Usher type 1C gene. *Nat Genet*, 2000, 26: 56-60
- [21] Weil D, Blanchard S, Kaplan J, et al. Defective myosin VIIA gene responsible for Usher syndrome type 1B. *Nature*, 1995, 374: 60-1
- [22] Gibson F, Walsh J, Mburu P, et al. A type VII myosin encoded by the mouse deafness gene shaker-1. *Nature*, 1995, 374: 62-4
- [23] Kros CJ, Marcotti W, van Netten SM, et al. Reduced climbing and increased slipping adaptation in cochlear hair cells of mice with *Myo7a* mutations. *Nat Neurosci*, 2002, 5: 41-7
- [24] Weil D, El-Amraoui A, Masmoudi S, et al. Usher syndrome type I G (USH1G) is caused by mutations in the gene encoding SANS, a protein that associates with the USH1C protein, harmonin. *Hum Mol Genet*, 2003, 12: 463-71
- [25] Kikkawa Y, Shitara H, Wakana S, et al. Mutations in a new scaffold protein Sans cause deafness in Jackson shaker mice. *Hum Mol Genet*, 2003, 12: 453-61
- [26] Caberlotto E, Michel V, Foucher I, et al. Usher type 1G protein sans is a critical component of the tip-link complex, a structure controlling actin polymerization in stereocilia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 5825-30
- [27] Wang A, Liang Y, Fridell RA, et al. Association of unconventional myosin MYO15 mutations with human nonsyndromic deafness DFNB3. *Science*, 1998, 280: 1447-51
- [28] Probst FJ, Fridell RA, Raphael Y, et al. Correction of deafness in *shaker-2* mice by an unconventional myosin in a BAC transgene. *Science*, 1998, 280: 1444-7
- [29] Mburu P, Mustapha M, Varela A, et al. Defects in whirlin, a PDZ domain molecule involved in stereocilia elongation, cause deafness in the whirler mouse and families with DFNB31. *Nat Genet*, 2003, 34: 421-8
- [30] Belyantseva IA, Boger ET, Naz S, et al. Myosin-XVa is required for tip localization of whirlin and differential elongation of hair-cell stereocilia. *Nat Cell Biol*, 2005, 7: 148-56
- [31] Denk W, Holt JR, Shepherd GM, et al. Calcium imaging of single stereocilia in hair cells: localization of transduction channels at both ends of tip links. *Neuron*, 1995, 15: 1311-21
- [32] Lumpkin EA, Hudspeth AJ. Detection of Ca^{2+} entry through mechanosensitive channels localizes the site of mechano-electrical transduction in hair cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 10297-301
- [33] Beurg M, Fettiplace R, Nam JH, et al. Localization of inner hair cell mechanotransducer channels using high-speed calcium imaging. *Nat Neurosci*, 2009, 12: 553-8
- [34] Longo-Guess CM, Gagnon LH, Cook SA, et al. A missense mutation in the previously undescribed gene *Tmhs* underlies deafness in hurry-scurry (*hscy*) mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 7894-9
- [35] Xiong W, Grillet N, Elledge HM, et al. TMHS is an integral component of the mechanotransduction machinery of cochlear hair cells. *Cell*, 2012, 151: 1283-95
- [36] Kurima K, Peters LM, Yang Y, et al. Dominant and recessive deafness caused by mutations of a novel gene, *TMCI*, required for cochlear hair-cell function. *Nat Genet*, 2002, 30: 277-84
- [37] Vreugde S, Erven A, Kros CJ, et al. Beethoven, a mouse model for dominant, progressive hearing loss DFNA36. *Nat Genet*, 2002, 30: 257-8
- [38] Marcotti W, Erven A, Johnson SL, et al. *Tmc1* is necessary for normal functional maturation and survival of inner and outer hair cells in the mouse cochlea. *J Physiol*, 2006, 574: 677-98
- [39] Kawashima Y, Geleoc GS, Kurima K, et al. Mechano-transduction in mouse inner ear hair cells requires transmembrane channel-like genes. *J Clin Invest*, 2011, 121: 4796-809
- [40] Naz S, Giguere CM, Kohrman DC, et al. Mutations in a novel gene, *TMIE*, are associated with hearing loss linked to the *DFNB6* locus. *Am J Hum Genet*, 2002, 71: 632-6
- [41] Mitchem KL, Hibbard E, Beyer LA, et al. Mutation of the novel gene *Tmie* results in sensory cell defects in the inner ear of spinner, a mouse model of human hearing loss DFNB6. *Hum Mol Genet*, 2002, 11: 1887-98
- [42] Zhao B, Wu Z, Grillet N, et al. TMIE is an essential component of the mechanotransduction machinery of cochlear hair cells. *Neuron*, 2014, 84: 954-67
- [43] Beurg M, Xiong W, Zhao B, et al. Subunit determination of the conductance of hair-cell mechanotransducer channels. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 1589-94
- [44] Kim KX, Beurg M, Hackney CM, et al. The role of transmembrane channel-like proteins in the operation of hair cell mechanotransducer channels. *J Gen Physiol*, 2013, 142: 493-505
- [45] Mizutari K, Fujioka M, Hosoya M, et al. Notch inhibition induces cochlear hair cell regeneration and recovery of hearing after acoustic trauma. *Neuron*, 2013, 77: 58-69
- [46] Lentz JJ, Jodelka FM, Hinrich AJ, et al. Rescue of hearing and vestibular function by antisense oligonucleotides in a mouse model of human deafness. *Nat Med*, 2013, 19: 345-50
- [47] Zheng JL, Gao WQ. Overexpression of *Math1* induces robust production of extra hair cells in postnatal rat inner ears. *Nat Neurosci*, 2000, 3: 580-6
- [48] Sage C, Huang M, Karimi K, et al. Proliferation of functional hair cells *in vivo* in the absence of the retinoblastoma protein. *Science*, 2005, 307: 1114-8
- [49] White PM, Doetzlhofer A, Lee YS, et al. Mammalian cochlear supporting cells can divide and trans-differentiate into hair cells. *Nature*, 2006, 441: 984-7
- [50] Li H, Liu H, Heller S. Pluripotent stem cells from the adult mouse inner ear. *Nat Med*, 2003, 9: 1293-9
- [51] Oshima K, Shin K, Diensthuber M, et al. Mechano-sensitive hair cell-like cells from embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell*, 2010, 141: 704-16
- [52] Chen W, Jongkamonwiwat N, Abbas L, et al. Restoration of auditory evoked responses by human ES-cell-derived otic progenitors. *Nature*, 2012, 490: 278-82

- [53] Koehler KR, Mikosz AM, Molosh AI, et al. Generation of inner ear sensory epithelia from pluripotent stem cells in 3D culture. *Nature*, 2013, 500: 217-21
- [54] Akil O, Seal RP, Burke K, et al. Restoration of hearing in the VGLUT3 knockout mouse using virally mediated gene therapy. *Neuron*, 2012, 75: 283-93
- [55] Yu Q, Wang Y, Chang Q, et al. Virally expressed connexin 26 restores gap junction function in the cochlea of conditional *Gjb2* knockout mice. *Gene Ther*, 2014, 21: 71-80
- [56] Geleoc GS, Holt JR. Sound strategies for hearing restoration. *Science*, 2014, 344: 1241062