

# 大規模平行定序所發現 TMC1 基因變異之聽力表徵

林寶雲

陳小娟

吳振吉

高師大聽語所

高師大聽語所

台大醫院內科部

## 一、研究背景與動機

聽覺缺損是人類感覺器官中最常見的缺陷，此疾病會讓溝通能力受限，影響認知和心理的發展(Morton & Nance, 2006)，國際衛生組織 (World Health Organization, WHO) 2013 年之報告指出，全球人口超過 5% (約 3.6 億人) 有聽力損失 (成人聽損是指聽閾大於等於 40 分貝，幼兒則是聽閾大於等於 30 分貝)。雙側重度到極重度的聽損患者約佔全球人口 500 分之 1，發生率隨著年齡增加而提高，五歲以上的幼兒一千個中有 2.7 個，青少年則是 3.5 個，若包括單側性聽損，幼兒時期聽損一千個中會有 3-6 個受影響，至青少年時期約再增加 2-4 個習語後聽損的發生，發生率也會隨地區、種族的不同而變化(Morton & Nance, 2006; Nance, 2003; Petit, 1996)。

聽損的發生包括先天性和後天性的因素，先天性聽損可能是一出生就聽損，或出生不久即發生聽損，一是由遺傳因素造成，例如一個或多個基因變異、二是耳朵的調節機轉、結構或功能異常。而後天性聽損是指某些環境因素所造成的聽覺系統創傷，例如噪音、感染、耳毒性藥物及其他因素等 (WHO, 2015)；文獻顯示先天性聽損有 50% 來自遺傳，若調查對象是以聽損兒童，則約有 2/3 也歸因於遺傳因素(Marazita et al., 1993)。

非症候群型聽損依據遺傳的模式，可區分為體染色體顯性遺傳 (DFNA, 20%)、體染色體隱性遺傳 (Deafness Autosomal Recessive, DFNB, 75%)、X 性聯遺傳 (Deafness X-link, DFNX, <1%)、Y 性聯遺傳 (Deafness Y-link, DFNY, <1%)、以及粒線體遺傳 (小於 1%) (Cryns & Van Camp, 2004; Godinho et al., 2003; Pfeilsticker et al., 2004; Van Laer et al., 2003)。目前已發表且與聽損相關的有 83 個基因和 144 個基因座，預估未來將有超過 300 個基因和聽損相關，相當於人類所有基因的 1%，其中 134 個基因和非症候群型聽損相關，最常見的變異基因是 *GJB2*，占非症候群型聽損 50% 以上，其中約 10%-20% 為習語前聽損；其次是 *SLC26A4*、*OTOF*、*TMC1* 等基因(Mahdieh et al., 2010)。

目前施行基因檢測，以大規模平行定序技術平行處理的方式，同時掃描大量基因序列，因此可快速得到超過十億個基因片段之資訊(Hawkins et al., 2010)，用來確定致

病基因(Taylor et al., 2013)。因此基因分子學之診斷已有良好之檢測工具，逐漸解開未知之遺傳性聽損病因，進而正確診斷，有正確的診斷才能有效地預防及治療。

過去基因檢測採用的是傳統直接定序測序方法，成本昂貴、費時及耗費人力，難以一次同時掃描所有聽損基因，無法在有明顯多病例之家族中，發現新的聽損致病基因；此技術雖有其優點但仍有所侷限。至於大規模平行定序，則可透過較低的成本和較高的速度執行數十億個核苷酸的平行測序，克服這些限制，使這項技術成為特別強大的工具；台灣在 2013 年發表第一篇針對台灣漢人族群所做的耳聾基因大規模平行定序研究。未來應用大規模平行定序，進行全面的聽損基因檢測，將成為護理聾人或重聽患者未來的第一步，並提供人工耳蝸介入預測預後訊息和遺傳諮詢，促進患者康復策略。

本研究應用台大醫院的聽損基因研究計劃之數據，針對台灣聽損家族，選擇 129 個已知的聽損基因做定序掃描，完成多病例家族的基因診斷，並從十個家族中挑選 *TMC1* 聽損家族，將其聽力表徵逐一說明。研究目的如下：(一) 針對這些新發現的變異基因，所導致的聽力表徵，與之前國外文獻所發表的案例，做更細緻之比較，分析基因型和表現型之關係，釐清台灣新發現基因變異基因型-表現型可能之關係，並描述本土新的基因變異的聽力形態、特徵與發病時間。(二) 針對 *TMC1* 基因在多病例家族中，詳述其新的變異基因的聽力表徵、家族的遺傳模式、蛋白質序列的改變、以及變異位點。

## 二、簡介遺傳性聽損

### (一) 遺傳性聽損與流行病學

所謂的「遺傳性聽損」(hereditary hearing impairment) 可依是否合併身體其他器官的異常，區分為症候群型 (syndromic hearing loss, SHL) 與非症候群型 (non-syndromic hearing loss, NSHL) 兩類，症候群型聽損約佔 30%，可依據觀察到的其他器官異常，做病例的分類及判別，因此較容易做出臨床診斷；包括骨骼畸形、視力異常、腎、甲狀腺、血液、心臟功能等異常(Bitner-Glindzicz, 2002; Ludman & Wright, 1998; van Camp et al., 1995)，例如，較常見的症候群型遺傳性聽損：Pendred 症候群(聽損合併甲狀腺腫)、Usher 氏症候群(聽損合併色素性視網膜炎)、Waardenburg 症候群(聽損合併前額白髮及內眥異位)、Jervell & Lange-Nielsen 症候群(聽損合併心率不整)等等。而另外 70% 則是非症候群型聽損(Krantz et al., 2004; Morton, N. E., 1991)，只出現聽力缺損的症狀。非症候群型聽損因為缺乏可供辨識的臨床表徵，大多只能利用基因診斷的方式來進行分類。

## (二) 遺傳性聽損之常見基因

西元 1997 年，可以說是非症候群型遺傳性聽損之基因研究飛躍的一年，在這一年，比較重要的基因座候選基因 (candidate gene)，如 DFNB1 的 *GJB2* (Cx26) 基因 (Kelsell et al., 1997) 及 DFNA1 的 *DIAPH1* 基因 (Lynch et al., 1997) 相繼被發現，此外也發現臨床上較為常見的基因：包含 *SLC264A*、粒線體 DNA 突變 (12S rRNA 基因)、以及 *OTOF* 基因等。

## 三、遺傳性聽損基因檢測之方法

### (一) 傳統基因檢測

最早期所採行的基因檢測方法，係使用 DNA 直接定序 (direct sequencing) 的方法。針對多個常見的致病基因，進行聽損的基因檢測，同時也兼顧臨床上較重要的幾個基因，減少遺漏。使用此種方法之優點是可以獲得整段完整 DNA 序列資料，對於確認基因以及 DNA 直接定序，具有高敏感性和特異性，但其限制則是耗費大量的人力、物力及時間。

### (二) SNaPshot 基因檢測法

迄今為止，與聽損有關的基因變異，不出 30 至 50 個位點，若針對已知的基因突變進行掃描，可以涵括台灣聽損突變患者之 98%，正確率 (accuracy) 高達 99% 以上。由於台灣 98% 以上都是由漢人組成，所以種族組成不若歐美人種複雜。然而其侷限如下：其一，須根據現有的基因流行病學資料作設計，換言之，SNaPshot 基因檢測法僅能偵測已知突變，對於未知的新突變，則無法檢測；其二，目前已知可導致非症候群型聽損的基因近 83 個基因，此方法則只能檢測其中少數較常見的耳聾基因，無法偵測出新的未知基因，單獨使用此方法有所限制。

### (三) 大規模平行定序之基因檢測

大規模平行定序技術以平行處理的方式，同時掃描大量基因序列，因此可快速掃描大量基因片段資訊。此種在單一反應中即可掃描大量基因序列的特性，使得大規模平行定序非常適合用來偵測如聽損等基因異質性高的疾病之致病位點，台灣針對已知 130 個耳聾基因做定序掃描，建構大規模平行定序資料的分析方法與過濾流程，建立耳聾基因檢測平臺，完成多病例家族的基因診斷。

#### 四、個案篩選及收集

本研究個案收集是從台大醫院耳鼻喉部、婦聯聽障文教基金會、雅文兒童聽語文教基金會、財團法人佛教慈濟綜合醫院、以及成大醫院的聽損者中，有明顯基因突變的多病例個案家族，選出五個符合下列條件：(一) 未能於臺灣常見之三個耳聾基因外顯子 (*GJB2* 基因、*SLC26A4* 基因與粒線體 12S RNA 基因) 中找出致病位點，(二) 家族中有兩個以上的非症候群型聽損個案。簽署同意書後以兩管 EDTA 採血管抽取 3 ml 的血液，家族成員則是以棉棒採集兩管口腔黏膜細胞。

每名聽損個案由耳鼻喉科醫師問診及檢查，排除以下情況：胎內感染、低體重兒(體重小於1500公克)、出生缺氧或使用呼吸器、高黃疸指數、有細菌性腦膜炎病史、耳毒性藥物使用、以及頭部外傷；並儘量記錄這些多病例個案家族在過去病史、理學檢查、聽力檢查、以及影像檢查之結果。

#### 五、次世代定序技術

次世代定序技術是利用平行定序的方式，快速讀取大量的基因序列。因此，次世代定序可得到與直接定序同樣準確的序列資訊，且由於其平行定序的方式，可同時讀取許多 DNA 片段，因而節省大量的時間與經費。

#### 六、聽力學評估

##### (一) 純音聽力檢查

依照 ANSI 標準在隔音室裡操作，檢測 500 Hz 到 8000 Hz 的全音程頻率。

##### (二) 耳聲傳射檢測

耳聲傳射 (Otoacoustic emissions, OAEs) 可檢測外毛細胞生理功能，正常耳蝸的毛細胞對聲音所產生的聲能反射，聽損超過 20 dBHL 至 30 dBHL，就不會產生耳聲傳射 (Kemp, 2002)。測驗時，以一個探頭麥克風放入耳道內，聲能由麥克風偵測與收集。

##### (三) 聽性腦幹反應檢測 (ABR)

ABR 可檢測內耳的完整性、上行聽覺通道的反應，亦可偵測出聽神經病變，使用 click 或 tone burst 的刺激音，用 27.1/sec 的速率測閾值，分析視窗 (The Analysis Time Window) 為 15 ms，Band-pass 設定為 100 Hz 至 3000 Hz。刺激音量，由高到低以 10 dBnHL 為步距，在每一音量，進行 1024 次的平均值，直到五波消失，取得閾值後，再進一步和純音聽力及其他檢測作交叉比對。

## 七、結果與討論

本研究選出 *TMC1* 為體染色體隱性遺傳，以下逐一敘述其聽力表徵，除了列表，也以圖形方式呈現，具體而言，呈現的訊息包括下列五項：(1) 基因變異的種類、(2) 家族樹狀圖，包括個案之家族譜呈現的遺傳模式，例如在變異位點與聽損性狀呈現共同分離，若無變異基因則不發病，有變異基因存在才會導致聽損、(3) 蛋白質序列比對，即以九個動物種類比對（包括人、黑猩猩、猴子、小鼠、大鼠、牛、狗、雞、斑馬魚），(4) 變異的位點，利用直接定序確認，也包括對偶基因中，核苷酸的改變與突變的種類、以及(5) 聽力圖的變化等。

## 八、體染色體顯性基因變異與聽力表徵

體染色體隱性遺傳基因變異之聽力表徵

### *TMC1* 變異

個案為7歲男童，*TMC1* 基因變異兩個對偶基因複合異型合子，此家族為體染色體隱性聽損，體染色體隱性需兩個對偶基因皆有變異才會發病導致聽損，次世代定序發現分別為第383個核苷酸由C變成T(c. 383C→T)，使蛋白質序列第128個，由脯氨酸(Proline)變成白氨酸(Leucine)(p. P128L)的錯義突變。另一對偶基因為第958個與第960個核苷酸之間發生刪除(c. 958\_960del)，因此形成移碼突變(frameshift)，這是指鹼基數目的增減，造成非三的倍數，改變基因的閱讀框架，使得其蛋白質序列從第320個胺基酸開始改變(p. 320\_320del)，為一新的位點，*TMC1* 的蛋白質序列部份一般是新發現的錯義突變才需要做序列比對 *TMC1*:c. 383C→T:p. P128L 為已知突變

*TMC1*:c. 958\_960del:p. 320\_320del 為核苷酸缺失，因此也不需要蛋白質序列比對。家中成員個案的大姊為先天性重度到極重度聽損且有相同的基因變異，祖父母、父母及其中一個姊姊都是正常聽力。父母及姊姊接受抽血檢查的結果顯示都是一個對偶基因變異的帶原者。

本研究個案出生時未通過新生兒聽篩 OAE，聽性腦幹檢查雙側 50 ndBHL 有反應，個案一歲檢查之聽閾：右耳 250 Hz 為 75dB、500 Hz 為 65 dB、1000 Hz 為 70 dB、2000 Hz 為 70dB、4000 Hz 為 70dB、8000 Hz 為 80dB；左耳 250 Hz 為 85dB、500 Hz 為 70dB、1000 Hz 為 70dB、2000 Hz 為 75 dB、4000 Hz 為 75dB、8000 Hz 為 80dB；三歲時之純音聽閾右耳 500 Hz 為 100dB、1000 Hz 為 105dB、2000 Hz 為 105dB、4000 Hz 為 105dB；

左耳 500 Hz 為 100dB、1000 Hz 為 105dB、2000 Hz 為 110 dB、4000 Hz 為 105dB，為漸進性、重度到極重度聽損(圖 1)。個案三歲進行人工耳蝸植入，術後語言辨識力成效表現良好。

*TMCI* 致病基因變異在 2002 年被 Kurima 等人確認和體染色體顯性 DFNA36 以及隱性遺傳 DFNB7/11 非症候群型聽力損失相關(Kurima et al., 2002)，在土耳其聽損家族中，發生率更高，高達 6.6%之隱性遺傳非症候群型聽力損失為此種突變(Kalay et al., 2005; Kitajiri et al., 2007; Meyer et al., 2005; Santos et al., 2005)，且聽力表徵大部份都是先天、習語前、重度到極重度聽損。而北美發現的基因變異聽損家族則和體染色體顯性非症候群型聽力損失相關，聽力表徵為習語後、漸進性感覺神經性聽損。2014 年中國進行一個六代聽損家族研究，確認 *TMCI* 基因變異新的位點，此文獻指出 *TMCI* 係導致體染色體顯性非症候群型遺傳性聽損 DFNA36 的致病基因，其聽力表徵與本研究相似的部分包括：習語後、雙側、漸進性感覺神經性聽損，最初發現為中度中高頻率聽損(Zhao et al., 2014)，聽損隨年齡增加，逐漸變成重度到極重度聽損。

本研究個案聽力表徵和國外之前文獻相較，和 DFNA36 聽力表徵，習語後、雙側、以及漸進性感覺神經性聽損相似，也和 2011 荷蘭確認 *TMCI* 新的位點所描述的聽力表徵相似，即習語後，漸進性感覺神經性聽損和本研究 *TMCI* 家族相似(de Heer et al., 2011)，但卻不同於體染色體隱性遺傳 DFNB7/11。

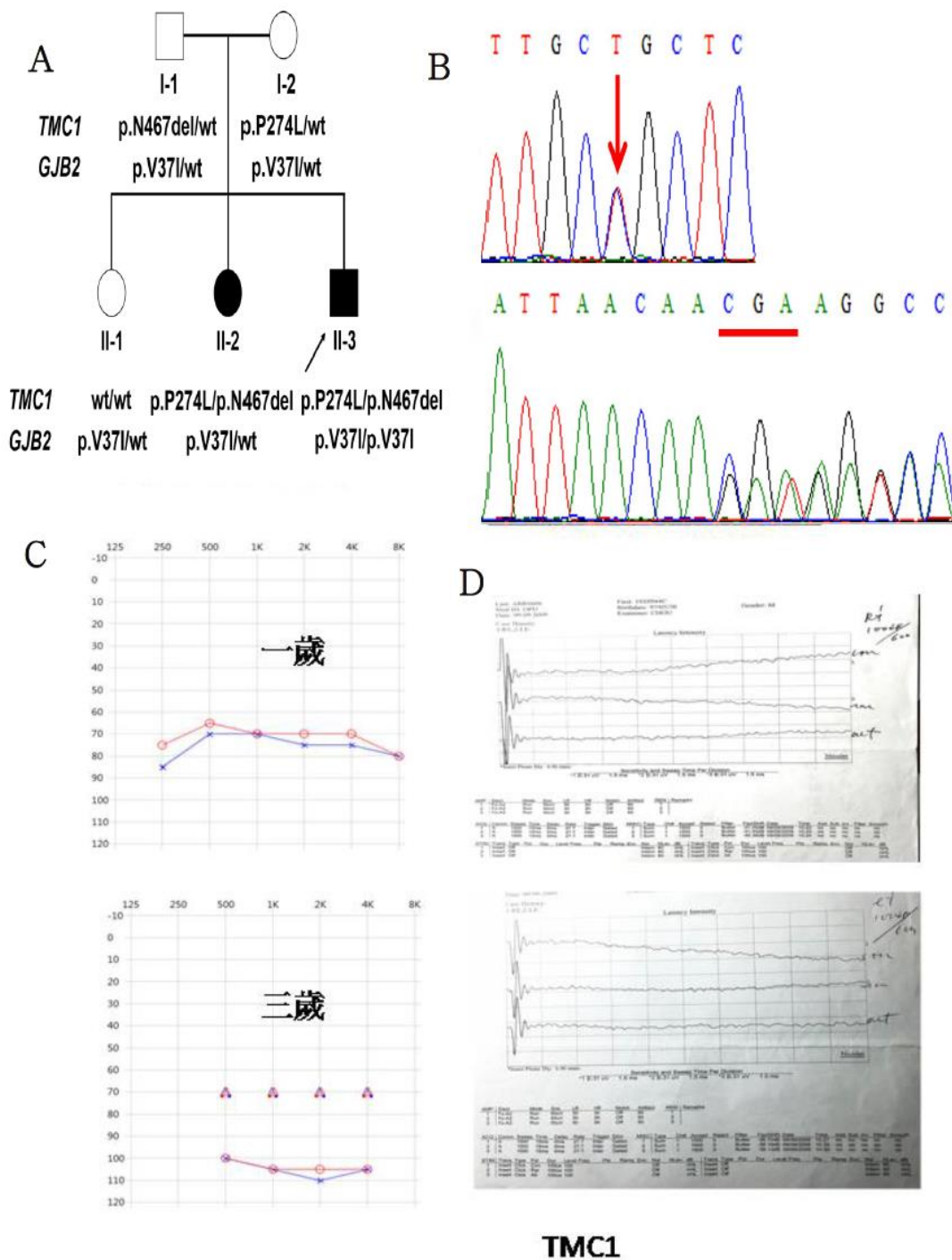


圖 1 次世代定序結果發現 *TMC1* 基因變異

- (A) 個案之家族譜呈現體染色體隱性遺傳模式，*TMC1* 基因 (c. 383C→T)、(c. 958\_960del) 變異位點與聽損性狀呈現共同分離；
- (B) 利用直接定序確認第 383 個核苷酸由 C 變成 T，(c. 383C→T)，核苷酸之間發生刪除 (c. 958\_960del)；

- (C) 個案一歲之聽力圖 PTA 閾值右耳為 86 dBHL 左耳閾值為 74 dBHL，中重度聽損；三歲之聽力圖 PTA 閾值右耳為 104dBHL；左耳閾值為 105dBHL，漸進性聽損至極重度聽損，聽力圖 *o* 為右耳氣導，<右耳骨導；×為左耳氣導，>左耳骨導。
- (D) 雙側聽性腦幹檢查無反應。

## 九、結論與建議

### *TMC1* 變異

*TMC1* 基因到目前已經有 29 個被確認的變異位點 (GenBank accession number: NM\_138691.2)，*TMC1* 基因被確定為體染色體顯性和隱性遺傳非症候群型聽力損失，分別造成 DFNA36 和 DFNB7 / 11 的聽力損失。超過 30 個 DFNB7 / 11 突變已被確認，但是只有三個 DFNA36 突變被報告過，以大量樣本篩檢的中國聽損家族的研究發現，案例是體染色體顯性 DFNA36 突變，聽力表徵為習語後、漸進性感覺神經性聽力喪失，與之前北美、伊朗聽損家族文獻所報導 DFNA36 是一致的 (Zhao et al., 2014)。

*TMC1* 突變是在巴基斯坦最常見的基因，導致蛋白質截短，並導致先天性重度聽損 (Ben Said et al., 2010; Hilgert, 2008; Hilgert et al., 2008; Sirmaci et al., 2009)，為巴基斯坦第三名的體染色體隱性遺傳聽損變異基因，也是全世界造成體染色體隱性聽力損失第六大常見基因。其中最常見的隱性遺傳非症候群型聽力損失在 *TMC1* 基因是 p.R34X，白種人 c.100C→T 有 40% 是此致病位點 (Hilgert et al., 2008)，DFNB7 / 11 所有報告病例都顯示出相似的表现型特徵，習語前、重度到極重度聽力損失。

而個案 *TMC1* 家族中，大姊是重度到極重度聽損，且帶有相同變異基因，經過家族譜分析推斷，此家族為體染色體隱性遺傳模式，但在個案身上則發現異型合子 (heterozygous) 的變異位點，顯示個案及大姐帶有另外一個未知的隱藏變異位點，或是其聽損是由其他未做檢測的基因所導致。本研究中的個案不同於其他國家文獻所報告，而是漸進型、習語前、以及中度聽力損失；但因個案人數量少，未來若是有更多個案數，則將會有更強的證據可解釋說明，這類案例和其他文獻不同表現型的因素。

## 十、研究限制

國外 AudioGene 同時利用網站收集年齡與純音聽力數據，包括 250Hz、500Hz、1000Hz、2000Hz、4000Hz、以及 8000Hz 之聽閾，以之預估體染色體顯性基因型和表現型



(<http://audiogene.eng.uiowa.edu/>)，所以本研究也針對收集到的聽力資料進行歸納分析，同樣用純音聽閾、聽性腦幹檢測。聽力評估內容分為主觀資料及客觀資料，主觀資料包括純音聽力檢測與語音聽力檢測等，而客觀資料則有中耳功能檢測、耳聲傳射、聽性腦幹反應、以及穩定狀態誘發聽性腦幹反應，本研究個案資料收集因來自不同機構，在聽力評估資料部分，只有純音聽力分頻頻率數值、簡易純音閾值、或聽性腦幹測試，因個人因素或環境因素無法取得更多聽力學評估資料，為本研究一大限制。

是否會造成研究上的缺失限制，雖然未有確定答案，但未來文獻如果是要探討基因變異的聽力表徵，那麼完整的聽力評估資料檔案（客觀及主觀的）仍是必要的。

## 十一、參考資料

1. Ben Said, M., Hmani-Aifa, M., Amar, I., Baig, S. M., Mustapha, M., Delmaghani, S., Tlili, A., Ghorbel, A., Ayadi, H., Van Camp, G., Smith, R. J., Tekin, M., Masmoudi, S. (2010). High frequency of the p.R34X mutation in the TMC1 gene associated with nonsyndromic hearing loss is due to founder effects. *Genet Test Mol Biomarkers*, 14(3), 307-311. doi: 10.1089/gtmb.2009.0174
2. Bitner-Glindzicz, M. (2002). Hereditary deafness and phenotyping in humans. *British medical bulletin*, 63, 73-94.
3. Cryns, K., Van Camp, G. (2004). Deafness genes and their diagnostic applications. *Audiol Neurootol*, 9(1), 2-22. doi: 10.1159/000074183
4. de Heer, A. M., Collin, R. W., Huygen, P. L., Schraders, M., Oostrik, J., Rouwette, M., Kunst, H. P., Kremer, H., Cremers, C. W. (2011). Progressive sensorineural hearing loss and normal vestibular function in a Dutch DFNB7/11 family with a novel mutation in TMC1. *Audiol Neurootol*, 16(2), 93-105. doi: 10.1159/000313282
5. Godinho, R., Keogh, I., Eavey, R. (2003). Perda auditiva genética. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, 69, 100-104.
6. Hawkins, R. D., Hon, G. C., Ren, B. (2010). Next-generation genomics: an integrative approach. *Nature Genetics*, 11(7), 476-486. doi: 10.1038/nrg2795
7. Hilgert, N. (2008). Gene symbol: TMC1. Disease: Hearing loss. *Human Genetics*, 124(3), 305.
8. Hilgert, N., Alasti, F., Dieltjens, N., Pawlik, B., Wollnik, B., Uyguner, O., Delmaghani, S., Weil, D., Petit, C., Danis, E., Yang, T., Pandelia, E., Petersen, M. B., Goossens, D., Favero, J. D., Sanati, M. H., Smith, R. J., Van Camp, G. (2008). Mutation analysis of TMC1 identifies four new mutations and suggests an additional deafness gene at loci DFNA36 and DFNB7/11. *Clinical Genetics*, 74(3), 223-232. doi: 10.1111/j.1399-0004.2008.01053.x
9. <http://audiogene.eng.uiowa.edu/>.
10. Kalay, E., Karaguzel, A., Caylan, R., Heister, A., Cremers, F. P., Cremers, C. W., Brunner, H. G., de Brouwer, A. P., Kremer, H. (2005). Four novel TMC1 (DFNB7/DFNB11) mutations in Turkish patients with congenital autosomal recessive nonsyndromic

- hearing loss. *Human Mutation*, 26(6), 591. doi: 10.1002/humu.9384
11. Kelsell, D. P., Dunlop, J., Stevens, H. P., Lench, N. J., Liang, J. N., Parry, G., Mueller, R. F., Leigh, I. M. (1997). Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature Genetics*, 387(6628), 80-83. doi: 10.1038/387080a0
  12. Kitajiri, S. I., McNamara, R., Makishima, T., Husnain, T., Zafar, A. U., Kittles, R. A., Ahmed, Z. M., Friedman, T. B., Riazuddin, S., Griffith, A. J. (2007). Identities, frequencies and origins of TMC1 mutations causing DFNB7/B11 deafness in Pakistan. *Clinical Genetics*, 72(6), 546-550. doi: 10.1111/j.1399-0004.2007.00895.x
  13. Krantz, I. D., McCallum, J., DeScipio, C., Kaur, M., Gillis, L. A., Yaeger, D., Jukofsky, L., Wasserman, N., Bottani, A., Morris, C. A., Nowaczyk, M. J., Toriello, H., Bamshad, M. J., Carey, J. C., Rappaport, E., Kawauchi, S., Lander, A. D., Calof, A. L., Li, H. H., Devoto, M., Jackson, L. G. (2004). Cornelia de Lange syndrome is caused by mutations in NIPBL, the human homolog of *Drosophila melanogaster* Nipped-B. *Nature Genetics*, 36(6), 631-635. doi: 10.1038/ng1364
  14. Kurima, K., Peters, L. M., Yang, Y., Riazuddin, S., Ahmed, Z. M., Naz, S., Arnaud, D., Drury, S., Mo, J., Makishima, T., Ghosh, M., Menon, P. S., Deshmukh, D., Oddoux, C., Ostrer, H., Khan, S., Riazuddin, S., Deininger, P. L., Hampton, L. L., Sullivan, S. L., Battey, J. F., Jr., Keats, B. J., Wilcox, E. R., Friedman, T. B., Griffith, A. J. (2002). Dominant and recessive deafness caused by mutations of a novel gene, TMC1, required for cochlear hair-cell function. *Nature Genetics*, 30(3), 277-284. doi: 10.1038/ng842
  15. Ludman, Wright. (1998). *Diseases of the Ear*. New York: Oxford University Publishers.
  16. Lynch, E. D., Lee, M. K., Morrow, J. E., Welsh, P. L., Leon, P. E., King, M. C. (1997). Nonsyndromic deafness DFNA1 associated with mutation of a human homolog of the *Drosophila* gene diaphanous. *Science*, 278(5341), 1315-1318.
  17. Mahdieh, N., Rabbani, B., Wiley, S., Akbari, M. T., Zeinali, S. (2010). Genetic causes of nonsyndromic hearing loss in Iran in comparison with other populations. *Journal of Human Genetics*, 55(10), 639-648. doi: 10.1038/jhg.2010.96
  18. Marazita, M. L., Ploughman, L. M., Rawlings, B., Remington, E., Arnos, K. S., Nance, W. E. (1993). Genetic epidemiological studies of early-onset deafness in the U.S. school-age population. *American Journal of Medical Genetics*, 46(5), 486-491.
  19. Meyer, C. G., Gasmelseed, N. M., Mergani, A., Magzoub, M. M., Muntau, B., Thye, T., Horstmann, R. D. (2005). Novel TMC1 structural and splice variants associated with congenital nonsyndromic deafness in a Sudanese pedigree. *Human Mutation*, 25(1), 100. doi: 10.1002/humu.9302
  20. Morton, Nance. (2006). Newborn hearing screening--a silent revolution. *The New England Journal of Medicine*, 354(20), 2151-2164. doi: 10.1056/NEJMra050700
  21. Morton, N. E. (1991). Genetic epidemiology of hearing impairment. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 630, 16-31.
  22. Nance, W. E. (2003). The genetics of deafness. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*, 9(2), 109-119. doi: 10.1002/mrdd.10067

23. Petit, C. (1996). Genes responsible for human hereditary deafness: symphony of a thousand. *Nature Genetics*, 14(4), 385-391. doi: 10.1038/ng1296-385
24. Pfeilsticker, L. N., Stole, G., Sartorato, E. L., Delfino, D., Guerra, A. T. M. (2004). A investigação genética na surdez hereditária não-sindrômica. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, 70, 182-186.
25. Santos, R. L., Wajid, M., Khan, M. N., McArthur, N., Pham, T. L., Bhatti, A., Lee, K., Irshad, S., Mir, A., Yan, K., Chahrour, M. H., Ansar, M., Ahmad, W., Leal, S. M. (2005). Novel sequence variants in the TMC1 gene in Pakistani families with autosomal recessive hearing impairment. *Human Mutation*, 26(4), 396. doi: 10.1002/humu.9374
26. Sirmaci, A., Duman, D., Ozturkmen-Akay, H., Erbek, S., Incesulu, A., Ozturk-Hismi, B., Arici, Z. S., Yuksel-Konuk, E. B., Tasir-Yilmaz, S., Tokgoz-Yilmaz, S., Cengiz, F. B., Aslan, I., Yildirim, M., Hasanefendioglu-Bayrak, A., Aycicek, A., Yilmaz, I., Fitoz, S., Altin, F., Ozdag, H., Tekin, M. (2009). Mutations in TMC1 contribute significantly to nonsyndromic autosomal recessive sensorineural hearing loss: a report of five novel mutations. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 73(5), 699-705. doi: 10.1016/j.ijporl.2009.01.005
27. Taylor, K. R., Deluca, A. P., Shearer, A. E., Hildebrand, M. S., Black-Ziegelbein, E. A., Anand, V. N., Sloan, C. M., Eppsteiner, R. W., Scheetz, T. E., Huygen, P. L., Smith, R. J., Braun, T. A., Casavant, T. L. (2013). AudioGene: predicting hearing loss genotypes from phenotypes to guide genetic screening. *Human Mutation*, 34(4), 539-545. doi: 10.1002/humu.22268
28. van Camp, G., Coucke, P., Balemans, W., van Velzen, D., van de Bilt, C., van Laer, L., Smith, R. J., Fukushima, K., Padberg, G. W., Frants, R. R., et al. (1995). Localization of a gene for non-syndromic hearing loss (DFNA5) to chromosome 7p15. *Human Molecular Genetics*, 4(11), 2159-2163.
29. Van Laer, L., Cryns, K., Smith, R. J., Van Camp, G. (2003). Nonsyndromic hearing loss. *Ear Hear*, 24(4), 275-288. doi: 10.1097/01.aud.0000079805.04016.03
30. Zhao, Y., Wang, D., Zong, L., Zhao, F., Guan, L., Zhang, P., Shi, W., Lan, L., Wang, H., Li, Q., Han, B., Yang, L., Jin, X., Wang, J., Wang, J., Wang, Q. (2014). A Novel DFNA36 Mutation in TMC1 Orthologous to the Beethoven (Bth) Mouse Associated with Autosomal Dominant Hearing Loss in a Chinese Family. *PLoS One*, 9(5). doi: 10.1371/journal.pone.0097064