

# Ein Durchbruch für taub geborene Kinder: Erste erfolgreiche Gentherapie für Gehörlosigkeit

## Zusammenfassung

In mehreren klinischen Studien wurden bis heute (Stand Juni 2024) mehr als ein Duzend gehörlos geborene Kinder mit einer spezifisch dafür entwickelten Gentherapie behandelt – und können nun mit ihren eigenen Ohren hören, zu Musik tanzen, Worte nachsprechen, Fragen beantworten. Um dies zu erreichen, wurde eine Gen-Ersatztherapie für Kinder mit *OTOF*-bedingter Gehörlosigkeit angewendet. Dieser Übersichtsartikel erklärt, wie gut die Kinder nach bisherigem Kenntnisstand hören und welche Hörtests in Folgestudien weitere Erkenntnisse liefern könnten. Zuletzt wird ein Ausblick auf die breitere Anwendung dieser Gentherapie und den in Entwicklung befindlichen Gentherapien für weitere Formen der Gehörlosigkeit gegeben.

**Schlüsselwörter:** auditorische Synaptopathie, DFNB9, Otoferlin, Adeno-assoziierte Viren

## Ellen Reisinger<sup>1</sup>

1 Gentherapie für Schwerhörigkeit und Gehörlosigkeit, Universitätsklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde Tübingen, und Zentrum für Gen- und RNA Therapie (GRTC), Medizinische Fakultät der Universität Tübingen, Deutschland

## Die Gentherapie-Strategie für OTOF-bedingte Taubheit

Die Gentherapie gegen *OTOF*-bedingte Gehörlosigkeit (DFNB9) markiert den Beginn einer neuen Epoche: Zum ersten Mal ist es gelungen, vormals nahezu taube Kinder hörend zu machen. Praktisch über Nacht kann damit eine angeborene, genetisch bedingte Sinneseinschränkung kausal therapiert werden, wenn auch zunächst nur im Rahmen von klinischen Studien. Bei dieser Form der Taubheit liegt mechanistisch ein Defekt der synaptischen Übertragung von den inneren Haarzellen auf den Hörnerv vor, was sich typischerweise in einer an Taubheit grenzenden Schwerhörigkeit mit intakter Funktion der äußeren Haarzellen äußert, daher auch „auditorische Synaptopathie“ genannt [1], [2]. Therapeutisch wird das Fehlen des Proteins Otoferlin, das vom Gen *OTOF* kodiert wird, durch eine Gen-Ersatztherapie kompensiert. Zwei Adeno-assoziierte Viren (AAVs) schleusen je eine Hälfte der kodierenden Sequenz für Otoferlin in die inneren Haarzellen ein. Diese „Dual-AAV“-Strategie war erforderlich, da die kodierende Sequenz zu lang für den Transport mit einem AAV war [3], [4]. Im Zellkern werden die beiden kodierenden Sequenzen zusammengesetzt und sorgen für die Transkription und Translation des Proteins. Zunächst war in unabhängigen Studien gezeigt worden, dass nach Injektion dieser therapeutischen AAVs in das Innenohr von *Otof*-knock-out Mäusen diese hören können ([5], [6], später auch in [7], [8]). In den letzten Monaten wurde auf Konferenzen und in Fachzeitschriften berichtet, dass diese Strategie auch bei gehörlos geborenen Kindern funktioniert: Die Hörschwellen lagen einige Wochen nach der Gentherapie im besten Fall bei 38 dB HL (pure tone average, PTA), und die Kinder reagierten auf ihren Namen

und konnten fast durchweg mindestens einfache Wörter wiederholen [9], [10], [11].

## Wie gut hören die Kinder mit dieser Gentherapie?

Nachdem jetzt die ersten Ergebnisse dieser klinischen Studien veröffentlicht sind, sollten wir diese genau ansehen und klug nutzen, um gegebenenfalls die Gentherapie weiter zu verbessern. Gezeigt wurden die Schwellen aus Hirnstammaudiometrie (Brainstem evoked response audiometry/BERA und auditory steady state response/ASSR) sowie bei den älteren Kindern die Tonaudiometrie, die auf Hörschwellen von 38–75 dB HL hindeuten. Allerdings sind nur in wenigen Studien auch die Rohdaten der BERA abgebildet und werden auch hier nicht mit den BERA-Wellen normalhörender Kinder verglichen. Für wirklich gute Hörergebnisse ist es jedoch entscheidend, ob genügend Otoferlin-Protein in den inneren Haarzellen produziert wird, was wir bei den Kindern jedoch nicht direkt ermitteln können. Auf welche zusätzlichen Parameter daher ein besonderes Augenmerk gelegt werden sollte, wissen wir aus den Beschreibungen von Betroffenen mit (wahrscheinlich) niedrigeren Otoferlin-Mengen, die durch Punktmutationen in Otoferlin bedingt sind. Ein Geschwisterpaar mit einer solchen Mutation, *OTOF*-p.Ile515Thr, zeigte beispielsweise nur geringfügig erhöhte Hörschwellen in der Tonaudiometrie, jedoch eine deutlich abnorme Hirnstammaudiometrie [12]. In der BERA war lediglich eine Welle V erkennbar, diese zudem verzögert und mit deutlich verringerter Amplitude [13]. Bei einer Serie von Click-Stimuli wurde zwar der erste Click recht zuverlässig in Welle V abgebildet, die nachfolgenden jedoch mit abnehmender Amplitude, sodass die Welle V bei nachfolgen-

den Clicks immer seltener detektierbar war [13]. Auch die Adaptation an längere, konstante Stimuli war deutlich verstärkt; im Hochtonbereich noch ausgeprägter als im Tieftonbereich – so konnten diese Betroffenen einen (deutlich überschwelligen) 8 kHz-Ton nach 90 Sekunden kaum noch wahrnehmen [13]. Während das Sprachverstehen für einfache Wörter bei 88–100% lag, war das Sprachverstehen im Alltag deutlich stärker beeinträchtigt und betrug im Störgeräusch (HINT-C Test) unter 10% [12], [14]. Neben dem beschriebenen Geschwisterpaar fanden sich ähnliche Hörprobleme in fünf Patienten mit anderen Mutationen in *OTOF* [15]. Die Ausprägung einer derartigen Hörstörung wurde in einem Mausmodell näher untersucht, in welches gentechnisch die *Otof-p.Ile515Thr*-Mutation eingebracht wurde [16]. Während in der Hirnstammaudiometrie eine deutliche Hörstörung gefunden wurde, mit reduzierten Amplituden und erhöhten Schwellen, zeigten die Mäuse in Verhaltensexperimenten fast normale Hörschwellen [16]. Somit scheint das Mausmodell den Phänotyp der Betroffenen gut zu rekapitulieren. Mittels Immunhistochemie stellten wir fest, dass die Menge an Otoferlin-Protein in den inneren Haarzellen um etwa 65% reduziert war [16]. Da Otoferlin für die synaptische Übertragung von Haarsinneszellen auf den Hörnerv benötigt wird [1], bestimmten wir auch bei dieser Mauslinie, inwiefern die synaptische Funktion durch die verringerte Menge an (mutiertem) Otoferlin beeinträchtigt ist. Hier zeigte sich, dass die Synapse auf kurze Stimuli zwar noch angemessen reagieren konnte, jedoch war die Nachlieferung von synaptischen Vesikeln bei länger andauernden Stimuli stark verlangsamt [16]. Dies hat zur Folge, dass ein zweiter Stimulus nur dann mit gleicher Intensität synaptisch übertragen wird, wenn die Synapse sich lange genug erholen kann. Auf das Sprachverstehen im Hintergrundgeräusch übertragen bedeutet dies, dass bereits durch das Störgeräusch die synaptische Übertragung an einer solchen Synapse ausgereizt wird, sodass zusätzliche Signale von der Sprache nicht mehr weitergegeben werden können. Zudem gaben die Synapsen einer Zelle ein Signal an die nachfolgenden Nervenzellen mit einer breiteren zeitlichen Streuung wieder. Dies bedeutet, dass Konsonanten „verwaschen“ wahrgenommen werden, und damit das Sprachverstehen, selbst ohne Hintergrundgeräusch, eingeschränkt sein kann. Beides zusammen erklärt auch, weshalb diese und weitere Betroffene mit ähnlichem Phänotyp nicht von Hörgeräten profitieren – lautere Stimuli führen eben zu einer schnelleren Ermüdung der Haarsinneszellen und erklären daher, warum höhere Schalldrücke das Sprachverstehen nicht verbessern [15].

Wie hoch die Otoferlin-Mengen in den inneren Haarzellen der gentherapeutisch behandelten Kinder sind, wissen wir derzeit nicht. Auch wenn ein Defizit in den besonders sensitiven Hörtests nur indirekt Rückschlüsse auf die Otoferlin-Menge geben würde und zudem durch viele Faktoren bedingt sein kann, sollten solche Tests dennoch unbedingt durchgeführt werden, um gegebenenfalls an einer Verbesserung der Therapie selbst oder einer spezifischen Nachsorge wie z.B. gezielten Hörtrainings arbeiten

zu können. In Mäusen wurde nach einer solchen Gentherapie Otoferlin-Proteinmengen von ca. 35% der normalen Menge gemessen, was ziemlich genau der Proteinmenge entspricht, die bei den *Otof-p.Ile515Thr*-Mäusen gefunden wurde [4], [5]. Beim Menschen könnte diese Proteinmenge nach der Gentherapie höher oder auch niedriger sein. Neben potentiellen Problemen beim Sprachverstehen im Störgeräusch könnte sich eine leicht schwächere Synapsenleistung auch darin äußern, dass die mit Gentherapie Behandelten höhere kognitive Leistungen aufbringen müssen, um das verwaschene Sprachsignal zu dekodieren und damit das Gehörte zu verstehen. Aufgrund der Problematik einer möglicherweise schneller ermüdenden Synapse ist es voraussichtlich auch nicht zielführend, die gentherapeutisch behandelten Personen mit Hörgeräten zu versorgen, um die mit 38–75 dB HL bei weitem nicht optimalen Hörschwellen zu korrigieren – zumindest solange noch regelrechte otoakustische Emissionen (OAE) nachweisen, dass die cochleäre Verstärkungsfunktion erhalten ist.

## Für welche Kinder mit DFNB9 ist die Gentherapie geeignet?

Wie gut die Gentherapie für *OTOF*-Taubheit derzeit wirklich ist, müssen also nachfolgende Studien mit detaillierteren Messungen des Hörvermögens und Sprachverstehens zeigen. Zudem wird die Langzeitbeobachtung der bereits behandelten Kinder aufschlussreich sein. Durch den Einschluss weiterer Kinder werden möglicherweise auftretende seltene Nebenwirkungen und Limitationen entdeckt. Von höchstem Interesse ist für die Familien vieler Betroffener, ob eine Gentherapie auch dann möglich ist, wenn bereits ein Cochlea-Implantat (CI) eingesetzt wurde. Die aktuellen schonenden OP-Verfahren sollten prinzipiell dazu geeignet sein, dass das Sinnesepithel intakt bleibt, was durch die Messung von OAEs bestätigt werden kann. Wenn dies der Fall ist, sollte eine Gentherapie möglich sein. Ein kritischer Prädiktor für eine erfolgreiche Gentherapie der *OTOF*-bedingten Gehörlosigkeit ist daher – bei implantierten wie bei nicht implantierten Ohren – das Vorhandensein von OAEs. Auch bei nicht implantierten Ohren gehen bei *OTOF*-Patienten die OAEs häufig innerhalb der ersten zwei Lebensjahre verloren; nur in seltenen Fällen sind sie im Erwachsenenalter nachweisbar [17], [18], [19]. In Mausmodellen wurde zudem gezeigt, dass auch innere Haarzellen bei Abwesenheit von Otoferlin absterben; dies ist jedoch bisher nur im Tiermodell eindeutig nachgewiesen [20]. Die derzeit laufenden klinischen Studien machten die erhaltenen OAEs zum Einschlusskriterium und schlossen CI-versorgte Ohren aus, da bei diesen das Risiko besteht, dass aufgrund der implantierten Elektrode und der dadurch hervorgerufenen Veränderung der Innenohrmechanik die Gentherapie nicht mehr so gut wirkt wie in nicht implantierten Ohren. Eine plausible Einschränkung für zukünftige Studien und Anwendungen der Gentherapie lässt sich aus Studie von Lv et al. [9] ableiten: Hier konnte bei einem vom 6 behan-

delten Kindern keine Verbesserung der Hörfähigkeit festgestellt werden. Dieses Kind hatte, im Gegensatz zu den anderen Kindern, eine bereits bestehende, wenn auch nicht sehr starke, Immunität gegen die Oberflächenproteine der hier eingesetzten viralen Vektoren, den AAVs des Serotyp 1 (AAV1). Bei allen Kindern stieg die Immunität gegen das verwendete Virus innerhalb weniger Tage nach der Behandlung stark an [9], [10], [11]. Entscheidend für den Erfolg der Gentherapie scheint zu sein, dass die viralen Vektoren ihre Zielzellen erreichen, bevor sie vom Immunsystem abgefangen werden. Sind die Viren erst einmal im Zytoplasma, sind sie vor dem unmittelbaren Angriff der zellulären und humoralen Immunreaktion geschützt. Die Oberflächenproteine der Viren werden abgebaut, und können von diesen Gentherapie-Viren nicht wiederhergestellt werden. Die Virus-DNA, die überwiegend aus dem therapeutischen Gen besteht, verbleibt über viele Jahre im Zellkern. Bei Zellen, die sich nicht mehr teilen – was auf die Sinneszellen des Innenohrs zutrifft – kann man daher davon ausgehen, dass einmal transduzierte Zellen über Jahre das therapeutische Gen exprimieren werden, sodass eine Wiederholung der Behandlung im Idealfall nicht notwendig ist. Die nach einer einmaligen Injektion von therapeutischen Viren in das Innenohr erwachte Immunität hat jedoch erhebliche Bedeutung für die Planung der Behandlung: Soll zunächst nur ein Ohr behandelt werden, könnte die danach bestehende Immunität gegen die Oberflächenproteine des Virus verhindern, dass das zweite Ohr erfolgreich behandelt werden kann – es sein denn, man verwendet Virus-Oberflächenproteine von anderen Serotypen, die keine Kreuzimmunität aufweisen. Interessanterweise werden in klinischen Studien derzeit mindestens zwei verschiedene Varianten von Oberflächenproteinen verwendet, die jedoch zumindest teilweise eine Kreuzimmunität erzeugen [21]. Die Entwicklung von neuen Serotypen, die einer vorliegenden Immunität entkommen, ist im Gange. Mit diesen wäre es möglich, das zweite Ohr mit anderen Gentherapie-Vektoren zu behandeln. Weiterhin wäre auch denkbar, eine weitere Variante gentherapeutischer Vektoren in ein bereits behandeltes Ohr zu injizieren, um die Proteinmenge an Otoferlin in den inneren Haarzellen zu steigern. Eine Überexpression durch eine Otoferlin-dual-AAV-Transduktion von normalhörenden Mäusen und Primaten erwies sich als unkritisch [5], [8], während eine zu niedrige Proteinmenge vermutlich zur oben beschriebenen Hörermüdung führt.

## Konsequenzen der neuen Gentherapie für die Diagnostik von Schwerhörigkeit bei Neugeborenen und Kleinkindern

Trotz möglicher Einschränkungen ist diese erste erfolgreiche Gentherapie gegen Gehörlosigkeit ein Durchbruch. Damit wird ein Paradigmenwechsel für die Diagnostik und Behandlung gehörlos geborener Kinder eingeleitet:

Während es bisher weitgehend irrelevant war, welche genetische Disposition ursächlich für die Hörminderung war, sollte ab jetzt mindestens für die Betroffenen mit auditorischer Synaptopathie/Neuropathie eine human-genetische Analyse durchgeführt werden, um zu prüfen, ob es für dieses Kind eine Gentherapie als Alternative zur Cochlea-Implantation gibt. Da ausgerechnet diese Form der Gehörlosigkeit jedoch in Neugeborenen-Hörscreenings, die auf OAEs basieren, übersehen wird [22], [23], ist es jetzt angebracht, den Einsatz von (aufwendigeren) hirnstammaudiometrischen Verfahren in Hörscreenings neu zu bewerten. In Deutschland werden pro Jahr schätzungsweise 60–90 Kinder mit auditorischer Synaptopathie/Neuropathie geboren, die nur mit diesen Verfahren sicher erkannt werden können – einschließlich der ca. 15–25 pro Jahr geborenen Kinder mit *OTOF*-bedingter Schwerhörigkeit [22], [23], [24], [25].

Nicht nur im Hinblick auf die Generierung des Hörvermögens in diesen Kindern sind diese Studien ein Durchbruch: Zum ersten Mal wurde die Dual-AAV-Strategie am Menschen angewendet, die es erlaubt, große Gene mit Hilfe von kleinen, nicht-pathogenen AAV-Viren in Zellen zu transportieren. Hier werden zwei Teilstücke der DNA mit zwei verschiedenen Viren in die Ohren gespritzt, die sich im Zellkern der Zellen wieder zusammenlagern und zur Transkription der intakten mRNA führen [26], [27], [28], [29]. Damit eröffnet die *OTOF*-Gentherapie neue Möglichkeiten für weitere genetisch bedingte Erkrankungen, die auf große Gene zurückzuführen sind, nicht nur auf Schwerhörigkeit oder Gehörlosigkeit begrenzt.

## Welche Formen der Schwerhörigkeit oder Taubheit werden als Nächstes gentherapeutisch behandelt?

Höchst wünschenswert wäre es, die häufigste genetisch bedingte Form der Schwerhörigkeit/Taubheit behandeln zu können: die rezessiv vererbte Form DFNB1, die auf Mutationen im Gen *GJB2* zurückgeht, und ca. 25% der gehörlos oder schwerhörig geborenen Kinder betrifft [30]. Dieses Gen kodiert für das Protein Connexin26, welches für den Kaliumionen-Transport innerhalb der Cochlea benötigt wird. Für die Entwicklung einer Gentherapie gibt es jedoch ein Problem: Für Mäuse ist das komplette Fehlen des *GJB2*-Gens embryonal lethal [31]. Studien an neueren Mausmodellen, bei welchen das Gen *GJB2* nur lokal im Innenohr oder erst nach der kritischen Phase der Embryonalentwicklung inaktiviert wurde, deuten darauf hin, dass Connexin26 sowohl während der Entwicklung des Innenohrs als auch für die Funktion des reifen Innenohrs benötigt wird [32]. Es ist jedoch nicht bekannt, weshalb die gleichen Mutationen bei den einen Betroffenen zu angeborenem starkem bis hochgradigem Hörverlust führt, bei ca. 25% der Betroffenen jedoch nur zu einer milden bis moderaten, mitunter progressiven Schwerhörigkeit [33]. Es gibt jedoch Hoffnung: Sowohl die neuen

Mausmodelle als auch ein von einer Firma (Sensorion, Montpellier, Frankreich) entwickeltes Primaten-Modell für die GJB2-Hörstörung wird weitere Forschung ermöglichen und es erlauben, gentherapeutische Vektoren zu testen. Eine Schwierigkeit für die Entwicklung der Gentherapie wird hier sein, dass das Gen nicht in den Sinneszellen des Innenohrs exprimiert werden soll, welche aber aufgrund ihrer zellulären Eigenschaften die gentherapeutischen Viren besonders gut aufnehmen. Hier müssen spezielle Viruskonstrukte entwickelt werden, um eine spezifische Expression in den Stützzellen und der Stria vascularis zu erreichen. Dies ist prinzipiell möglich, erfordert jedoch besonders sorgfältige toxikologische Tests in Primatenmodellen, sodass klinische Studien nicht unmittelbar bevorstehen. Letzteres gilt genauso für weitere Formen der genetisch bedingten Schwerhörigkeit: Während in vielen Fällen die betroffenen Gene während der Entwicklung des Innenohrs benötigt werden und daher beim Menschen pränatal verabreicht werden müssten, gab es in präklinischen Gentherapiestudien mit dem Gen *Tmprss3*, welches bei *DFNB8/10* betroffen ist, das Problem, dass sich Überexpression als toxisch erwies, und eine niedrige Expression als wenig effektiv [34]. Eine Gentherapie für eine zweite Form der Schwerhörigkeit, die beim Menschen erfolgreich ist, wird daher voraussichtlich noch etwas auf sich warten lassen.

## Anmerkungen

### Förderung

Ich danke der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die Unterstützung über das Heisenberg-Programm (Projektnummer 416097726).

### Danksagung

Ich danke Nicola Strenzke herzlich für ihre hilfreichen Kommentare zum Manuskript im Review-Verfahren.

### Interessenskonflikt

Die Autorin gibt an, Co-Autorin auf einem Patent zur Dual-AAV Gentherapie zu sein, welches die Universitätsmedizin Göttingen an die Firma Akouos Inc. lizenziert hat.

## Literatur

- Roux I, Safieddine S, Nouvian R, Grati M, Simmler MC, Bahloul A, Perfettini I, Le Gall M, Rostaing P, Hamard G, Triller A, Avan P, Moser T, Petit C. Otoferlin, defective in a human deafness form, is essential for exocytosis at the auditory ribbon synapse. *Cell*. 2006 Oct;127(2):277-89. DOI: 10.1016/j.cell.2006.08.040
- Vona B, Rad A, Reisinger E. The Many Faces of *DFNB9*: Relating Variants to Hearing Impairment. *Genes (Basel)*. 2020 Nov;11(12):1411. DOI: 10.3390/genes11121411
- Dong JY, Fan PD, Frizzell RA. Quantitative analysis of the packaging capacity of recombinant adeno-associated virus. *Hum Gene Ther*. 1996 Nov;7(17):2101-12. DOI: 10.1089/hum.1996.7.17-2101
- Reisinger E. Dual-AAV delivery of large gene sequences to the inner ear. *Hear Res*. 2020 Sep;394:107857. DOI: 10.1016/j.heares.2019.107857
- Al-Moyed H, Cepeda AP, Jung S, Moser T, Kügler S, Reisinger E. A dual-AAV approach restores fast exocytosis and partially rescues auditory function in deaf otoferlin knock-out mice. *EMBO Mol Med*. 2019 Jan;11(1):e9396. DOI: 10.15252/emmm.201809396
- Akil O, Dyka F, Calvet C, Emptoz A, Lahlou G, Nouaille S, Boutet de Monvel J, Hardelin JP, Hauswirth WW, Avan P, Petit C, Safieddine S, Lustig LR. Dual AAV-mediated gene therapy restores hearing in a *DFNB9* mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 Mar;116(10):4496-501. DOI: 10.1073/pnas.1817537116
- Zhang L, Wang H, Xun M, Tang H, Wang J, Lv J, Zhu B, Chen Y, Wang D, Hu S, Gao Z, Liu J, Chen ZY, Chen B, Li H, Shu Y. Preclinical evaluation of the efficacy and safety of AAV1-hOTOF in mice and nonhuman primates. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2023 Dec;31:101154. DOI: 10.1016/j.omtm.2023.101154
- Qi J, Zhang L, Tan F, Zhang Y, Zhou Y, Zhang Z, Wang H, Yu C, Jiang L, Liu J, Chen T, Wu L, Zhang S, Sun S, Sun S, Lu L, Wang Q, Chai R. Preclinical Efficacy And Safety Evaluation of AAV-OTOF in *DFNB9* Mouse Model And Nonhuman Primate. *Adv Sci (Weinh)*. 2024 Jan;11(3):e2306201. DOI: 10.1002/advs.202306201
- Lv J, Wang H, Cheng X, Chen Y, Wang D, Zhang L, Cao Q, Tang H, Hu S, Gao K, Xun M, Wang J, Wang Z, Zhu B, Cui C, Gao Z, Guo L, Yu S, Jiang L, Yin Y, Zhang J, Chen B, Wang W, Chai R, Chen ZY, Li H, Shu Y. AAV1-hOTOF gene therapy for autosomal recessive deafness 9: a single-arm trial. *Lancet*. 2024 May;403(10441):2317-25. DOI: 10.1016/S0140-6736(23)02874-X
- Qi J, Tan F, Zhang L, Lu L, Zhang S, Zhai Y, Lu Y, Qian X, Dong W, Zhou Y, Zhang Z, Yang X, Jiang L, Yu C, Liu J, Chen T, Wu L, Tan C, Sun S, Song H, Shu Y, Xu L, Gao X, Li H, Chai R. AAV-Mediated Gene Therapy Restores Hearing in Patients with *DFNB9* Deafness. *Adv Sci (Weinh)*. 2024 Mar;11(11):e2306788. DOI: 10.1002/advs.202306788
- Wang H, Chen Y, Lv J, Cheng X, Cao Q, Wang D, Zhang L, Zhu B, Shen M, Xu C, Xun M, Wang Z, Tang H, Hu S, Cui C, Jiang L, Yin Y, Guo L, Zhou Y, Han L, Gao Z, Zhang J, Yu S, Gao K, Wang J, Chen B, Wang W, Chen ZY, Li H, Shu Y. Bilateral gene therapy in children with autosomal recessive deafness 9: single-arm trial results. *Nat Med*. 2024 Jun;30:1898-904. DOI: 10.1038/s41591-024-03023-5
- Starr A, Sininger Y, Winter M, Derebery MJ, Oba S, Michalewski HJ. Transient deafness due to temperature-sensitive auditory neuropathy. *Ear Hear*. 1998 Jun;19(3):169-79. DOI: 10.1097/00003446-199806000-00001
- Wynne DP, Zeng FG, Bhatt S, Michalewski HJ, Dimitrijevic A, Starr A. Loudness adaptation accompanying ribbon synapse and auditory nerve disorders. *Brain*. 2013 May;136(Pt 5):1626-38. DOI: 10.1093/brain/awt056
- Varga R, Avenarius MR, Kelley PM, Keats BJ, Berlin CI, Hood LJ, Morlet TG, Brashears SM, Starr A, Cohn ES, Smith RJ, Kimberling WJ. OTOF mutations revealed by genetic analysis of hearing loss families including a potential temperature sensitive auditory neuropathy allele. *J Med Genet*. 2006 Jul;43(7):576-81. DOI: 10.1136/jmg.2005.038612
- Santarelli R, Scimemi P, Costantini M, Domínguez-Ruiz M, Rodríguez-Ballesteros M, Del Castillo I. Cochlear Synaptopathy due to Mutations in OTOF Gene May Result in Stable Mild Hearing Loss and Severe Impairment of Speech Perception. *Ear Hear*. 2021 Nov-Dec 01;42(6):1627-39. DOI: 10.1097/AUD.0000000000001052

16. Strenzke N, Chakrabarti R, Al-Moyed H, Müller A, Hoch G, Pangrsic T, Yamanbaeva G, Lenz C, Pan KT, Auge E, Geiss-Friedlander R, Urlaub H, Brose N, Wichmann C, Reisinger E. Hair cell synaptic dysfunction, auditory fatigue and thermal sensitivity in otoferlin lle515Thr mutants. *EMBO J*. 2016 Dec;35(23):2519-35. DOI: 10.15252/embj.201694564
17. Rodríguez-Ballesteros M, del Castillo FJ, Martín Y, Moreno-Pelayo MA, Morera C, Prieto F, Marco J, Morant A, Gallo-Terán J, Morales-Angulo C, Navas C, Trinidad G, Tapia MC, Moreno F, del Castillo I. Auditory neuropathy in patients carrying mutations in the otoferlin gene (OTOF). *Hum Mutat*. 2003 Dec;22(6):451-6. DOI: 10.1002/humu.10274
18. Rodríguez-Ballesteros M, Reynoso R, Olarte M, Villamar M, Morera C, Santarelli R, Arslan E, Medá C, Curet C, Völter C, Sainz-Quevedo M, Castorina P, Ambrosetti U, Berrettini S, Frei K, Tedín S, Smith J, Cruz Tapia M, Cavallé L, Gelvez N, Primignani P, Gómez-Rosas E, Martín M, Moreno-Pelayo MA, Tamayo M, Moreno-Barral J, Moreno F, del Castillo I. A multicenter study on the prevalence and spectrum of mutations in the otoferlin gene (OTOF) in subjects with nonsyndromic hearing impairment and auditory neuropathy. *Hum Mutat*. 2008 Jun;29(6):823-31. DOI: 10.1002/humu.20708
19. Kitao K, Mutai H, Namba K, Morimoto N, Nakano A, Arimoto Y, Sugiyuchi T, Masuda S, Okamoto Y, Morita N, Sakamoto H, Shintani T, Fukuda S, Kaga K, Matsunaga T. Deterioration in Distortion Product Otoacoustic Emissions in Auditory Neuropathy Patients With Distinct Clinical and Genetic Backgrounds. *Ear Hear*. 2019;40(1):184-91. DOI: 10.1097/AUD.0000000000000586
20. Stalman U, Franke AJ, Al-Moyed H, Strenzke N, Reisinger E. Otoferlin Is Required for Proper Synapse Maturation and for Maintenance of Inner and Outer Hair Cells in Mouse Models for DFNB9. *Front Cell Neurosci*. 2021;15:677543. DOI: 10.3389/fncel.2021.677543
21. Schwartz MK, Likhite S, Vetter TA, Baird MC, McGovern V, Sierra Delgado A, Mendel T, Burghes A, Meyer KC. In-depth comparison of Anc80L65 and AAV9 retinal targeting and characterization of cross-reactivity to multiple AAV serotypes in humans. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2023 Sep;30:16-29. DOI: 10.1016/j.omtm.2023.05.016
22. Iwasa YI, Nishio SY, Yoshimura H, Sugaya A, Kataoka Y, Maeda Y, Kanda Y, Nagai K, Naito Y, Yamazaki H, Ikezono T, Matsuda H, Nakai M, Tona R, Sakurai Y, Motegi R, Takeda H, Kobayashi M, Kihara C, Ishino T, Morita SY, Iwasaki S, Takahashi M, Furutate S, Oka SI, Kubota T, Arai Y, Kobayashi Y, Kikuchi D, Shintani T, Ogasawara N, Honkura Y, Izumi S, Hyogo M, Ninoyu Y, Suematsu M, Nakayama J, Tsuchihashi N, Okami M, Sakata H, Yoshihashi H, Kobayashi T, Kumakawa K, Yoshida T, Esaki T, Usami SI. Detailed clinical features and genotype-phenotype correlation in an OTOF-related hearing loss cohort in Japan. *Hum Genet*. 2022 Apr;141(3-4):865-75. DOI: 10.1007/s00439-021-02351-7
23. Ford CL, Riggs WJ, Quigley T, Keifer OP Jr, Whitton JP, Valayannopoulos V. The natural history, clinical outcomes, and genotype-phenotype relationship of otoferlin-related hearing loss: a systematic, quantitative literature review. *Hum Genet*. 2023 Oct;142(10):1429-49. DOI: 10.1007/s00439-023-02595-5
24. Del Castillo I, Morín M, Domínguez-Ruiz M, Moreno-Pelayo MA. Genetic etiology of non-syndromic hearing loss in Europe. *Hum Genet*. 2022 Apr;141(3-4):683-96. DOI: 10.1007/s00439-021-02425-6
25. Yoshimura H, Okubo T, Shinagawa J, Nishio SY, Takumi Y, Usami SI. Epidemiology, aetiology and diagnosis of congenital hearing loss via hearing screening of 1537913 newborns. *Int J Epidemiol*. 2024 Apr;53(3):dyae052. DOI: 10.1093/ije/dyae052
26. Sun L, Li J, Xiao X. Overcoming adeno-associated virus vector size limitation through viral DNA heterodimerization. *Nat Med*. 2000 May;6(5):599-602. DOI: 10.1038/75087
27. Yan Z, Zhang Y, Duan D, Engelhardt JF. Trans-splicing vectors expand the utility of adeno-associated virus for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Jun;97(12):6716-21. DOI: 10.1073/pnas.97.12.6716
28. Chao H, Mao L, Bruce AT, Walsh CE. Sustained expression of human factor VIII in mice using a parvovirus-based vector. *Blood*. 2000 Mar;95(5):1594-9.
29. Trapani I, Colella P, Sommella A, Iodice C, Cesi G, de Simone S, Marrocco E, Rossi S, Giunti M, Palfi A, Farrar GJ, Polishchuk R, Auricchio A. Effective delivery of large genes to the retina by dual AAV vectors. *EMBO Mol Med*. 2014 Feb;6(2):194-211. DOI: 10.1002/emmm.201302948
30. Del Castillo I, Morín M, Domínguez-Ruiz M, Moreno-Pelayo MA. Genetic etiology of non-syndromic hearing loss in Europe. *Hum Genet*. 2022 Apr;141(3-4):683-96. DOI: 10.1007/s00439-021-02425-6
31. Gabriel HD, Jung D, Bützler C, Temme A, Traub O, Winterhager E, Willecke K. Transplacental uptake of glucose is decreased in embryonic lethal connexin26-deficient mice. *J Cell Biol*. 1998 Mar;140(6):1453-61. DOI: 10.1083/jcb.140.6.1453
32. Chen P, Wu W, Zhang J, Chen J, Li Y, Sun L, Hou S, Yang J. Pathological mechanisms of connexin26-related hearing loss: Potassium recycling, ATP-calcium signaling, or energy supply? *Front Mol Neurosci*. 2022;15:976388. DOI: 10.3389/fnmol.2022.976388
33. Sakata A, Kashio A, Koyama M, Urata S, Koyama H, Yamasoba T. Hearing and Hearing Loss Progression in Patients with Gene Mutations: A Long-Term Follow-Up. *Int J Mol Sci*. 2023 Nov;24(23):16763. DOI: 10.3390/ijms242316763
34. Aaron KA, Pekrun K, Atkinson PJ, Billings SE, Abitbol JM, Lee IA, Eitawil Y, Chen YS, Dong W, Nelson RF, Kay MA, Cheng AG. Selection of viral capsids and promoters affects the efficacy of rescue of Tmprss3-deficient cochlea. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2023 Sep;30:413-28. DOI: 10.1016/j.omtm.2023.08.004

### Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. rer. nat. Ellen Reisinger  
Gentherapie für Schwerhörigkeit und Gehörlosigkeit,  
Universitätsklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde  
Tübingen, und Zentrum für Gen- und RNA Therapie  
(GRTC), Medizinische Fakultät der Universität Tübingen,  
Elfriede-Aulhorn-Straße 5, 72076 Tübingen, Deutschland

### Bitte zitieren als

Reisinger E. Ein Durchbruch für taub geborene Kinder: Erste erfolgreiche Gentherapie für Gehörlosigkeit. *GMS Z Audiol (Audiol Acoust)*. 2024;6:Doc11. DOI: 10.3205/zaud000046, URN: urn:nbn:de:0183-zaud0000460

### Artikel online frei zugänglich unter

<https://doi.org/10.3205/zaud000046>

Veröffentlicht: 13.08.2024

### Copyright

©2024 Reisinger. Dieser Artikel ist ein Open-Access-Artikel und steht unter den Lizenzbedingungen der Creative Commons Attribution 4.0 License (Namensnennung). Lizenz-Angaben siehe <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

# Breakthrough for deaf born children: First successful gene therapy for hearing impairment

## Abstract

In several clinical studies to date (as of June 2024), more than a dozen children born deaf have been treated with a gene therapy developed specifically for this purpose – and can now hear with their own ears, dance to music, repeat words and answer questions. To achieve this, a gene supplementation therapy was used for children with *OTOF-related* deafness. This review article explains how well the children hear according to current knowledge and which hearing tests could provide further insights in follow-up studies. Finally, an outlook is given on the broader application of this gene therapy and the gene therapies under development for other forms of deafness.

**Keywords:** auditory synaptopathy, DFNB9, otoferlin, adeno-associated viruses

Ellen Reisinger<sup>1</sup>

1 Gene Therapy for Hearing Impairment, Department of Otorhinolaryngology Tübingen, and Gene and RNA Therapy Center (GRTC), Faculty of Medicine, University of Tübingen, Germany

## Design of the gene therapy for the cure of hearing impairment due to *OTOF* mutations

The successful gene therapy for *OTOF-related* deafness (DFNB9) marks the beginning of a new era: for the first time, it is possible to restore hearing to children who were previously effectively deaf. Virtually overnight, a congenital, genetic sensory impairment can now be treated causally, albeit currently only in clinical trials. In this form of deafness, synaptic transmission from the inner hair cells to the auditory nerve is impaired, which typically manifests itself in severe to profound hearing impairment with intact function of the outer hair cells, hence also called “auditory synaptopathy” [1], [2]. Therapeutically, the absence of the protein otoferlin, which is encoded by the gene *OTOF*, is compensated for by a gene supplementation therapy. Two adeno-associated viruses (AAVs) each introduce one half of the coding sequence for otoferlin into the inner hair cells. This “dual-AAV” or “split-AAV” strategy was necessary because the coding sequence was too long to be transported with one AAV [3], [4]. In the nucleus, the two coding sequences are assembled and ensure transcription and translation of the protein. First, independent studies had shown that when these therapeutic AAVs were injected into the inner ear of *Otof*-knockout mice, hearing was restored ([5], [6], later also in [7], [8]). In recent months, it has been reported at conferences and in scientific journals that this strategy also works in children born deaf: a few weeks after gene therapy hearing thresholds were at best 38 dB HL (pure tone average, PTA), and almost all of the children responded to their names and could repeat at least simple words [9], [10], [11].

## How good is the hearing of children treated with the gene therapy?

Now that the first results of these clinical studies have been published, we should take a close look and use them wisely to further improve the gene therapy if necessary. The thresholds from auditory brainstem response recordings (ABR) and auditory steady state responses (ASSR) and, in older children, tone audiometry indicated hearing thresholds of 38–75 dB HL. However, only few studies present the raw ABR data, and even these are not compared with the ABR waves of children with normal hearing. For really good hearing results, however, it is crucial whether sufficient otoferlin protein is produced in the inner hair cells, which we cannot determine directly in the children. However, we know from the descriptions of affected individuals with (presumably) lower levels of otoferlin caused by point mutations in otoferlin which additional parameters in hearing assessments should be considered. For example, a two siblings with such a mutation, *OTOF*-p.Ile515Thr, showed only slightly increased hearing thresholds in tone audiometry, but clearly abnormal brainstem audiometry [12]. In the ABR, only wave V was recognizable, which was delayed and reduced in amplitude [13]. In a train of click stimuli, the first click was quite reliably represented in wave V, but the subsequent clicks were decreased in amplitude, so that wave V was less and less detectable in later clicks [13]. Adaptation to continuous stimuli was also strongly pronounced, more so in the high-frequency range than in the low-frequency range: these patients could barely perceive a (clearly suprathreshold) 8 kHz tone at the end of a 90 second auditory stimulus [13]. While speech comprehension for simple words reached 88–100%, it was

severely impaired in everyday life and was less than 10% in background noise (HINT-C test) [12], [14]. In addition to the described siblings, similar hearing problems were found in five patients with other mutations in *OTOF* [15]. The underlying cellular and molecular dysfunction of this kind of hearing disorder was examined in more detail in a mouse model into which the *Otof-p.Ile515Thr* mutation was genetically introduced [16]. While a clear hearing impairment was found in brainstem audiometry, with reduced amplitudes and increased thresholds, the mice showed almost normal hearing thresholds in behavioral experiments [16]. Thus, the mouse model seems to recapitulate the phenotype of affected individuals well. Using immunohistochemistry, we found that the amount of otoferlin protein in the inner hair cells was reduced by about 65% [16]. Since otoferlin is required for synaptic transmission from hair cells to the auditory nerve [1], we also determined the extent to which synaptic function is impaired by the reduced amount of (mutated) otoferlin in this mouse line. It was found that the synapse was still able to respond appropriately to short stimuli, but the replenishment of synaptic vesicles was greatly slowed down during sustained stimuli [16]. As a result, at this synapse, a subsequent stimulus is only transmitted with the same intensity if the synapse can recover long enough. Applied to speech comprehension in background noise, this implies that the synaptic transmission at such a synapse is already exhausted by the background noise, so that additional signals from the speech can no longer be passed on. In addition, the synapses of a cell transmit a signal to the subsequent nerve cells with a wider temporal spread. This means that consonants are perceived as “blurred”, which can limit speech comprehension, even without background noise. Together, these findings explain why these and other affected people with a similar phenotype do not benefit from hearing aids: higher sound pressures do not improve speech comprehension because they lead to faster fatigue of the hair cell synapses [15].

We currently do not know how high the otoferlin levels are in the inner hair cells of children treated with gene therapy. Even if a deficit in the particularly sensitive hearing assessments would only indirectly indicate the amount of otoferlin and can also be caused by many factors, such tests should still be carried out in order to be able to work on improving the therapy itself or developing specific aftercare, such as targeted hearing training. In mice, otoferlin protein levels of approximately 35% of normal were measured after such gene therapy, which corresponds almost exactly to the amount of protein found in the *Otof-p.Ile515Thr* mice [4], [5]. In humans, this amount of protein could be higher or lower after gene therapy. In addition to potential problems with speech comprehension in noise, a slightly weaker performance of the inner hair cell synapse could also mean that those treated with gene therapy have to exert greater cognitive effort to decode the blurred speech signal. Due to the problem of a synapse that may exhaust more quickly, it is also unlikely that gene therapy-treated individuals be-

nefit from hearing aids in order to correct the hearing thresholds of 38–75 dB HL, which are far from optimal – unless hearing aids are required to compensate for impaired cochlear amplification, which can be assessed by recording otoacoustic emissions (OAEs).

## Which children with DFNB9 are eligible for this gene therapy?

Follow-up studies with more detailed measurements of hearing and speech comprehension will therefore have to show how good the gene therapy for *OTOF* deafness really is. In addition, the long-term observation of those children who have already been treated will be informative. The inclusion of more children will reveal any rare side effects and limitations that may occur. It is of great interest to many families of those affected whether gene therapy is also possible if a cochlear implant (CI) has already been inserted. The current gentle surgical procedures should in principle be suitable for ensuring that the sensory epithelium remains intact, which can be confirmed by measuring OAEs. If this is the case, gene therapy should be possible. A critical predictor of successful gene therapy for *OTOF*-induced deafness is therefore the presence of OAEs in both implanted and non-implanted ears. Even in non-implanted ears, OAEs are often lost within the first two years of life in *OTOF* patients; only in rare cases are OAEs detectable in adulthood [17], [18], [19]. In mouse models, it has also been shown that inner hair cells die in the absence of otoferlin; however, this has so far only been demonstrated in animal models [20]. The current clinical studies made the preserved OAEs an inclusion criterion and excluded CI-treated ears, as there is a risk that the gene therapy may not work as well as in non-implanted ears due to the implanted electrode and the resulting change in inner ear mechanics. A plausible limitation for future studies and applications of gene therapy can be derived from the study by Lv et al. [9]: here, no improvement in hearing ability was observed in one of the 6 children treated. In contrast to the other children, this child had a pre-existing, albeit not very strong, immunity to the surface proteins of the viral vectors used here, the AAVs of serotype 1 (AAV1). In all children, immunity to the respective virus rose sharply within a few days of treatment [9], [10], [11]. The decisive factor for the success of gene therapy appears to be that the viral vectors reach their target cells before they are intercepted by the immune system. Once the viruses are in the cytoplasm, they are protected from direct attack by the cellular and humoral immune response. The surface proteins of the viruses are degraded and cannot be regenerated by these gene therapy viruses. The viral DNA, which consists mainly of the therapeutic gene, remains in the cell nucleus for many years. In non-dividing cells, which is the case for the sensory cells of the inner ear – it can therefore be assumed that once transduced, the cells will express the therapeutic gene for years, so that in the ideal case it is not necessary to repeat the treat-

ment. However, the immunity awakened after a single injection of therapeutic viruses into the inner ear has significant implications for treatment planning: if only one ear is to be treated initially, the subsequent immunity to the surface proteins of the virus could prevent the second ear from being treated successfully – unless virus surface proteins from other serotypes that do not exhibit cross-immunity are used. Interestingly, at least two different variants of surface proteins are currently used in clinical trials, but the antibodies raised against those are at least partially cross-reactive [21]. The development of new serotypes that escape existing immunity is underway. With these it would be possible to treat the second ear using other gene therapy vectors. It would also be conceivable to inject another variant of gene therapy vectors into an already treated ear in order to increase the amount of otoferlin protein in the inner hair cells. Some overexpression by otoferlin-dual-AAV transduction of normal hearing mice and primates proved to be uncritical [5], [8], whereas an insufficient amount of protein presumably leads to the auditory fatigue described above.

## Consequences of the new gene therapy for the diagnosis of hearing loss in newborns and infants

Despite possible limitations, this first successful gene therapy for deafness is a breakthrough. This will change how we diagnose and treat of children born deaf: while it was previously largely irrelevant which genetic disposition was the cause of the hearing loss, from now on a genetic analysis should be carried out – at least for those affected with auditory synaptopathy/neuropathy – in order to check whether gene therapy is available for this child as an alternative to cochlear implantation. However, since this form of deafness is overlooked in newborn hearing screenings based on OAEs [22], [23], it is now high time to re-evaluate the use of (more elaborate) auditory brainstem recordings in hearing screenings. In Germany, an estimated 60–90 children per year are born with auditory synaptopathy/neuropathy that can only be reliably detected with these procedures – including the approximately 15–25 children per year born with *OTOF*-related hearing loss [22], [23], [24], [25].

These studies are a breakthrough not only with regard to restoring hearing in these children: for the first time, the dual-AAV strategy has been used in humans, which allows large genes to be transported into cells with the help of small, non-pathogenic AAV viruses. Here, two pieces of DNA are injected into the ears with two different viruses, which reassemble in the nucleus of the cells and lead to transcription of the intact mRNA [26], [27], [28], [29]. *OTOF* gene therapy thus opens up new possibilities for other genetic diseases caused by large genes, not just limited to auditory disorders.

## Which forms of hearing impairment will be treated with gene therapy next?

It would be highly desirable to be able to treat the most common genetic form of hearing impairment: the recessive form DFNB1, which is caused by mutations in the *GJB2* gene and affects around 25% of children born deaf or hard of hearing [30]. This gene codes for the protein connexin26, which is required for the transport of potassium ions within the cochlea. However, there is a problem for the development of a gene therapy: for mice, the complete absence of the *GJB2* gene is embryonically lethal [31]. Studies on newer mouse models, in which the *GJB2* gene was inactivated only locally in the inner ear or only after the critical phase of embryonic development, indicate that connexin26 is required both during inner ear development and for the function of the mature inner ear [32]. However, it is not known why the same mutations lead to congenital severe to profound hearing loss in some affected individuals, but only mild to moderate, sometimes progressive hearing loss in approximately 25% of affected individuals [33]. Nevertheless, there is hope: the development of the new mouse models and a non-human primate model for *GJB2* hearing loss by a company (Sensorion, Montpellier, France) will facilitate further research and enable gene therapy vectors to be tested. One difficulty for the development of this gene therapy will be that the gene should not be expressed in the sensory cells of the inner ear, which are particularly efficient at absorbing gene therapy viruses due to their high plasma membrane turnover. In this case, special virus constructs must be developed to achieve specific expression in the supporting cells and the stria vascularis. This is possible, but requires careful toxicological tests in non-human primate models, so that clinical trials are not imminent. The latter also applies to other forms of genetic hearing loss: while in many cases the affected genes are required during the development of the inner ear and would therefore have to be administered prenatally in humans, preclinical gene therapy studies with the gene *TMPRSS3*, which is affected in DFNB8/10, encountered the problem that overexpression proved to be toxic, and low expression were less effective [34]. It is therefore likely that a gene therapy for a second form of hearing loss that is successful in humans will be some time in coming.

## Notes

## Funding

I would like to thank the German Research Foundation (DFG) for support through the Heisenberg Program (project number 416097726).



## Acknowledgments

I would like to thank Nicola Strenzke for her helpful comments on the manuscript during the review process.

## Competing interests

The author claims to be co-author on a patent for dual-AAV gene therapy licensed by the University of Göttingen to Akouos Inc./Eli Lilly.

## References

- Roux I, Safieddine S, Nouvian R, Grati M, Simmler MC, Bahloul A, Perfettini I, Le Gall M, Rostaing P, Hamard G, Triller A, Avan P, Moser T, Petit C. Otoferlin, defective in a human deafness form, is essential for exocytosis at the auditory ribbon synapse. *Cell*. 2006 Oct;127(2):277-89. DOI: 10.1016/j.cell.2006.08.040
- Vona B, Rad A, Reisinger E. The Many Faces of DFNB9: Relating Variants to Hearing Impairment. *Genes (Basel)*. 2020 Nov;11(12):1411. DOI: 10.3390/genes11121411
- Dong JY, Fan PD, Frizzell RA. Quantitative analysis of the packaging capacity of recombinant adeno-associated virus. *Hum Gene Ther*. 1996 Nov;7(17):2101-12. DOI: 10.1089/hum.1996.7.17-2101
- Reisinger E. Dual-AAV delivery of large gene sequences to the inner ear. *Hear Res*. 2020 Sep;394:107857. DOI: 10.1016/j.heares.2019.107857
- Al-Moyed H, Cepeda AP, Jung S, Moser T, Kügler S, Reisinger E. A dual-AAV approach restores fast exocytosis and partially rescues auditory function in deaf otoferlin knock-out mice. *EMBO Mol Med*. 2019 Jan;11(1):e9396. DOI: 10.15252/emmm.201809396
- Akil O, Dyka F, Calvet C, Emptoz A, Lahlou G, Nouaille S, Boutet de Monvel J, Hardelin JP, Hauswirth WW, Avan P, Petit C, Safieddine S, Lustig LR. Dual AAV-mediated gene therapy restores hearing in a DFNB9 mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 Mar;116(10):4496-501. DOI: 10.1073/pnas.1817537116
- Zhang L, Wang H, Xun M, Tang H, Wang J, Lv J, Zhu B, Chen Y, Wang D, Hu S, Gao Z, Liu J, Chen ZY, Chen B, Li H, Shu Y. Preclinical evaluation of the efficacy and safety of AAV1-hOTOF in mice and nonhuman primates. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2023 Dec;31:101154. DOI: 10.1016/j.omtm.2023.101154
- Qi J, Zhang L, Tan F, Zhang Y, Zhou Y, Zhang Z, Wang H, Yu C, Jiang L, Liu J, Chen T, Wu L, Zhang S, Sun S, Sun S, Lu L, Wang Q, Chai R. Preclinical Efficacy And Safety Evaluation of AAV-OTOF in DFNB9 Mouse Model And Nonhuman Primate. *Adv Sci (Weinh)*. 2024 Jan;11(3):e2306201. DOI: 10.1002/advs.202306201
- Lv J, Wang H, Cheng X, Chen Y, Wang D, Zhang L, Cao Q, Tang H, Hu S, Gao K, Xun M, Wang J, Wang Z, Zhu B, Cui C, Gao Z, Guo L, Yu S, Jiang L, Yin Y, Zhang J, Chen B, Wang W, Chai R, Chen ZY, Li H, Shu Y. AAV1-hOTOF gene therapy for autosomal recessive deafness 9: a single-arm trial. *Lancet*. 2024 May;403(10441):2317-25. DOI: 10.1016/S0140-6736(23)02874-X
- Qi J, Tan F, Zhang L, Lu L, Zhang S, Zhai Y, Lu Y, Qian X, Dong W, Zhou Y, Zhang Z, Yang X, Jiang L, Yu C, Liu J, Chen T, Wu L, Tan C, Sun S, Song H, Shu Y, Xu L, Gao X, Li H, Chai R. AAV-Mediated Gene Therapy Restores Hearing in Patients with DFNB9 Deafness. *Adv Sci (Weinh)*. 2024 Mar;11(11):e2306788. DOI: 10.1002/advs.202306788
- Wang H, Chen Y, Lv J, Cheng X, Cao Q, Wang D, Zhang L, Zhu B, Shen M, Xu C, Xun M, Wang Z, Tang H, Hu S, Cui C, Jiang L, Yin Y, Guo L, Zhou Y, Han L, Gao Z, Zhang J, Yu S, Gao K, Wang J, Chen B, Wang W, Chen ZY, Li H, Shu Y. Bilateral gene therapy in children with autosomal recessive deafness 9: single-arm trial results. *Nat Med*. 2024 Jun;30:1898-904. DOI: 10.1038/s41591-024-03023-5
- Starr A, Sinyer Y, Winter M, Derebery MJ, Oba S, Michalewski HJ. Transient deafness due to temperature-sensitive auditory neuropathy. *Ear Hear*. 1998 Jun;19(3):169-79. DOI: 10.1097/00003446-199806000-00001
- Wynne DP, Zeng FG, Bhatt S, Michalewski HJ, Dimitrijevic A, Starr A. Loudness adaptation accompanying ribbon synapse and auditory nerve disorders. *Brain*. 2013 May;136(Pt 5):1626-38. DOI: 10.1093/brain/awt056
- Varga R, Avenarius MR, Kelley PM, Keats BJ, Berlin CI, Hood LJ, Morlet TG, Brashears SM, Starr A, Cohn ES, Smith RJ, Kimberling WJ. OTOF mutations revealed by genetic analysis of hearing loss families including a potential temperature sensitive auditory neuropathy allele. *J Med Genet*. 2006 Jul;43(7):576-81. DOI: 10.1136/jmg.2005.038612
- Santarelli R, Scimemi P, Costantini M, Domínguez-Ruiz M, Rodríguez-Ballesteros M, Del Castillo I. Cochlear Synaptopathy due to Mutations in OTOF Gene May Result in Stable Mild Hearing Loss and Severe Impairment of Speech Perception. *Ear Hear*. 2021 Nov-Dec 01;42(6):1627-39. DOI: 10.1097/AUD.0000000000001052
- Strenzke N, Chakrabarti R, Al-Moyed H, Müller A, Hoch G, Pangrsic T, Yamanbaeva G, Lenz C, Pan KT, Auge E, Geiss-Friedlander R, Urlaub H, Brose N, Wichmann C, Reisinger E. Hair cell synaptic dysfunction, auditory fatigue and thermal sensitivity in otoferlin Ile515Thr mutants. *EMBO J*. 2016 Dec;35(23):2519-35. DOI: 10.15252/embj.201694564
- Rodríguez-Ballesteros M, del Castillo FJ, Martín Y, Moreno-Pelayo MA, Morera C, Prieto F, Marco J, Morant A, Gallo-Terán J, Morales-Angulo C, Navas C, Trinidad G, Tapia MC, Moreno F, del Castillo I. Auditory neuropathy in patients carrying mutations in the otoferlin gene (OTOF). *Hum Mutat*. 2003 Dec;22(6):451-6. DOI: 10.1002/humu.10274
- Rodríguez-Ballesteros M, Reynoso R, Olarte M, Villamar M, Morera C, Santarelli R, Arslan E, Medá C, Curet C, Völter C, Sainz-Quevedo M, Castorina P, Ambrosetti U, Berrettini S, Frei K, Tedín S, Smith J, Cruz Tapia M, Cavallé L, Gelvez N, Primignani P, Gómez-Rosas E, Martín M, Moreno-Pelayo MA, Tamayo M, Moreno-Barral J, Moreno F, del Castillo I. A multicenter study on the prevalence and spectrum of mutations in the otoferlin gene (OTOF) in subjects with nonsyndromic hearing impairment and auditory neuropathy. *Hum Mutat*. 2008 Jun;29(6):823-31. DOI: 10.1002/humu.20708
- Kitao K, Mutai H, Namba K, Morimoto N, Nakano A, Arimoto Y, Sugiuchi T, Masuda S, Okamoto Y, Morita N, Sakamoto H, Shintani T, Fukuda S, Kaga K, Matsunaga T. Deterioration in Distortion Product Otoacoustic Emissions in Auditory Neuropathy Patients With Distinct Clinical and Genetic Backgrounds. *Ear Hear*. 2019;40(1):184-91. DOI: 10.1097/AUD.0000000000000586
- Stalmann U, Franke AJ, Al-Moyed H, Strenzke N, Reisinger E. Otoferlin Is Required for Proper Synapse Maturation and for Maintenance of Inner and Outer Hair Cells in Mouse Models for DFNB9. *Front Cell Neurosci*. 2021;15:677543. DOI: 10.3389/fncel.2021.677543
- Schwartz MK, Likhite S, Vetter TA, Baird MC, McGovern V, Sierra Delgado A, Mendel T, Burghes A, Meyer KC. In-depth comparison of Anc80L65 and AAV9 retinal targeting and characterization of cross-reactivity to multiple AAV serotypes in humans. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2023 Sep;30:16-29. DOI: 10.1016/j.omtm.2023.05.016

22. Iwasa YI, Nishio SY, Yoshimura H, Sugaya A, Kataoka Y, Maeda Y, Kanda Y, Nagai K, Naito Y, Yamazaki H, Ikezono T, Matsuda H, Nakai M, Tona R, Sakurai Y, Motegi R, Takeda H, Kobayashi M, Kihara C, Ishino T, Morita SY, Iwasaki S, Takahashi M, Furutate S, Oka SI, Kubota T, Arai Y, Kobayashi Y, Kikuchi D, Shintani T, Ogasawara N, Honkura Y, Izumi S, Hyogo M, Ninoyu Y, Suematsu M, Nakayama J, Tsuchihashi N, Okami M, Sakata H, Yoshihashi H, Kobayashi T, Kumakawa K, Yoshida T, Esaki T, Usami SI. Detailed clinical features and genotype-phenotype correlation in an OTOF-related hearing loss cohort in Japan. *Hum Genet.* 2022 Apr;141(3-4):865-75. DOI: 10.1007/s00439-021-02351-7
23. Ford CL, Riggs WJ, Quigley T, Keifer OP Jr, Whitton JP, Valayannopoulos V. The natural history, clinical outcomes, and genotype-phenotype relationship of otoferlin-related hearing loss: a systematic, quantitative literature review. *Hum Genet.* 2023 Oct;142(10):1429-49. DOI: 10.1007/s00439-023-02595-5
24. Del Castillo I, Morán M, Domínguez-Ruiz M, Moreno-Pelayo MA. Genetic etiology of non-syndromic hearing loss in Europe. *Hum Genet.* 2022 Apr;141(3-4):683-96. DOI: 10.1007/s00439-021-02425-6
25. Yoshimura H, Okubo T, Shinagawa J, Nishio SY, Takumi Y, Usami SI. Epidemiology, aetiology and diagnosis of congenital hearing loss via hearing screening of 153?913 newborns. *Int J Epidemiol.* 2024 Apr;53(3):dyae052. DOI: 10.1093/ije/dyae052
26. Sun L, Li J, Xiao X. Overcoming adeno-associated virus vector size limitation through viral DNA heterodimerization. *Nat Med.* 2000 May;6(5):599-602. DOI: 10.1038/75087
27. Yan Z, Zhang Y, Duan D, Engelhardt JF. Trans-splicing vectors expand the utility of adeno-associated virus for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Jun;97(12):6716-21. DOI: 10.1073/pnas.97.12.6716
28. Chao H, Mao L, Bruce AT, Walsh CE. Sustained expression of human factor VIII in mice using a parvovirus-based vector. *Blood.* 2000 Mar;95(5):1594-9.
29. Trapani I, Colella P, Sommella A, Iodice C, Cesi G, de Simone S, Marrocco E, Rossi S, Giunti M, Palfi A, Farrar GJ, Polishchuk R, Auricchio A. Effective delivery of large genes to the retina by dual AAV vectors. *EMBO Mol Med.* 2014 Feb;6(2):194-211. DOI: 10.1002/emmm.201302948
30. Del Castillo I, Morán M, Domínguez-Ruiz M, Moreno-Pelayo MA. Genetic etiology of non-syndromic hearing loss in Europe. *Hum Genet.* 2022 Apr;141(3-4):683-96. DOI: 10.1007/s00439-021-02425-6
31. Gabriel HD, Jung D, Bützler C, Temme A, Traub O, Winterhager E, Willecke K. Transplacental uptake of glucose is decreased in embryonic lethal connexin26-deficient mice. *J Cell Biol.* 1998 Mar;140(6):1453-61. DOI: 10.1083/jcb.140.6.1453
32. Chen P, Wu W, Zhang J, Chen J, Li Y, Sun L, Hou S, Yang J. Pathological mechanisms of connexin26-related hearing loss: Potassium recycling, ATP-calcium signaling, or energy supply? *Front Mol Neurosci.* 2022;15:976388. DOI: 10.3389/fnmol.2022.976388
33. Sakata A, Kashio A, Koyama M, Urata S, Koyama H, Yamasoba T. Hearing and Hearing Loss Progression in Patients with Gene Mutations: A Long-Term Follow-Up. *Int J Mol Sci.* 2023 Nov;24(23):16763. DOI: 10.3390/ijms242316763
34. Aaron KA, Pekrun K, Atkinson PJ, Billings SE, Abitbol JM, Lee IA, Eltawil Y, Chen YS, Dong W, Nelson RF, Kay MA, Cheng AG. Selection of viral capsids and promoters affects the efficacy of rescue of Tmprss3-deficient cochlea. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2023 Sep;30:413-28. DOI: 10.1016/j.omtm.2023.08.004

**Corresponding author:**

Prof. Dr. rer. nat. Ellen Reisinger  
Gene Therapy for Hearing Impairment, Department of Otorhinolaryngology Tübingen, and Gene and RNA Therapy Center (GRTC), Faculty of Medicine, University of Tübingen, Elfriede-Aulhorn-Straße 5, 72076 Tübingen, Germany

**Please cite as**

Reisinger E. Ein Durchbruch für taub geborene Kinder: Erste erfolgreiche Gentherapie für Gehörlosigkeit. *GMS Z Audiol (Audiol Acoust).* 2024;6:Doc11. DOI: 10.3205/zaud000046, URN: urn:nbn:de:0183-zaud0000460

**This article is freely available from**

<https://doi.org/10.3205/zaud000046>

**Published:** 2024-08-13

**Copyright**

©2024 Reisinger. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 License. See license information at <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.