

Aus dem Institut für Auditorische Neurowissenschaften

Prof. Dr. med. T. Moser

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Molekulare und elektrophysiologische Untersuchung der
Exozytose in der Maus-Cochlea

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Dr. rer. nat. Stefanie Schumm, geb. Krinner

aus

München

Göttingen 2023

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer: Prof. Dr. med. T. Moser

Ko-Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. T. Dresbach

Prüfungskommission

Referent: Prof. Dr. med. T. Moser

Ko-Referent: Prof. Dr. rer. nat. T. Dresbach

Drittreferentin: Prof. Dr. rer. nat. T. Pangršič

Datum der mündlichen Prüfung: 10.01.2024

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Molekulare und elektrophysiologische Untersuchung der Exozytose in der Maus-Cochlea" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 14.12.2023

.....

(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden publiziert in:

Krinner S, Predoehl F, Burfeind D, Vogl C, Moser T (2021): RIM-Binding Proteins Are Required for Normal Sound-Encoding at Afferent Inner Hair Cell Synapses. *Front Mol Neurosci* 14, 651935

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	II
Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1 Einleitung	1
1.1 Das periphere auditorische System: Außen-, Mittel- und Innenohr	1
1.2 Das Corti-Organ und Physiologie der innere Haarzellen.....	2
1.3 Molekulare Komposition der Bändersynapse	4
1.4 RIM-BPs	6
2 Material und Methoden	8
2.1 Versuchstiere	8
2.2 Chemikalien	8
2.3 Präparation des Corti-Organs.....	8
2.4 <i>Patch-clamp</i> Experimente	9
2.5 Immunhistochemie und Fluoreszenzmikroskopie	11
2.6 RNAscope®	12
2.7 Audiometrie.....	12
2.8 Statistik	13
3 Ergebnisse.....	14
3.1 Eingeschränkte Hörfunktion durch RIM-BP1/2 Verlust.....	14
3.2 Untersuchung der Expression von RIM-BP1 in Maus IHZ	16
3.3 Ca ²⁺ -Einstrom der IHZ ist weitgehend unabhängig von RIM-BP1	19
3.4 RIM-BP1 reguliert die Exozytose des RRP.....	21
4 Diskussion.....	24
5 Zusammenfassung.....	28
6 Publikation.....	29
7 Literaturverzeichnis	43

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Das periphere auditorische System.....	2
Abbildung 2: Das Corti-Organ und die innere Haarzelle.....	3
Abbildung 3: Bändersynapse.....	5
Abbildung 4: Eingeschränkte Hörfunktion durch RIM-BP1/2 Verlust.....	14
Abbildung 5: Expressions-Analyse von RIM-BP1 in Maus IHZ mittels Immunhistochemie..	17
Abbildung 6: Expressions-Analyse von RIM-BP1 in Maus IHZ mittels RNAscope®	18
Abbildung 7: Ca ²⁺ -Einstrom in IHZ ist weitgehend unabhängig von RIM-BP1.....	20
Abbildung 8: RIM-BP1 reguliert die Exozytose des RRP.....	22

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primäre Antikörper	11
Tabelle 2: Sekundäre Antikörper.....	11
Tabelle 3: Zusammenfassung der p -Werte aus der statistischen AEP Daten Analyse	16
Tabelle 4: Zusammenfassung der IHZ <i>whole-cell</i> Ca^{2+} -Ströme und der statistischen Analyse ...	21
Tabelle 5: Zusammenfassung der p -Werte aus der statistischen <i>patch-clamp</i> Daten Analyse	23

Abkürzungsverzeichnis

4-AP	4-Aminopyridin
AEP	Akustisch evozierte Potenziale
AZ	Aktive Zone
C57BL/6	Bezeichnung des Inzuchtstammes
CaBP	<i>calcium binding protein</i>
CAPS	Calcyphosin Gen
ELKS	<i>protein rich in the amino acids E, L, K and S</i>
CAST	<i>cytomatrix at the active zone-associated structural protein</i>
Ca _v	Spannungsabhängiger Kalziumkanal
CAZ	<i>cytomatrix at the active zone</i>
C _{fast}	Kapazitätskompensation für schnelle transiente Ströme
C _m	Membrankapazität
C _{slow}	Kapazitätskompensation für langsame transiente Ströme
CtBP	<i>C-terminal binding protein</i>
dB	Dezibel
SPL	<i>sound pressure level</i> , Schalldruckpegel
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DFNB	Autosomal rezessiv vererbte Schwerhörigkeit
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPOAE	Distorsionsprodukte otoakustischer Emissionen
DRBP	<i>drosophila melanogaster</i> RIM-BP
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
EPSP	Exzitatorisches postsynaptisches Potential
G	Leitfähigkeit
G _{max}	Maximale Leitfähigkeit
G _n	Normalisierte Leitfähigkeit
GSDB	<i>goat serum dilution buffer</i> , Ziegen Serum
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
I _{Ca}	Kalziumstrom
IHZ	Innere Haarzelle
IV	<i>current-voltage relationship</i> , Strom-Spannungs-Kurve
k	Steigungsfaktor
LAVES	Niedersächsischen Landesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
LJP	<i>liquid junction potential</i> , Diffusionspotenzial
MET	Mechanoelektrische Transduktion
mM	Millimolar
mOsm	Milliosmol
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
N.	<i>nervus</i>
NA	Numerische Apertur

p	Postnatal
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenaktivität
Q_{Ca}	Integrierter Kalziumstrom
RIM	<i>Rab3-interacting molecule</i>
RIM-BP	<i>Rab3-interacting molecule (RIM) - binding protein</i>
<i>RIM-BP1/2^{-/-}</i>	Genotypische Bezeichnung für RIM-BP1/2 Doppelknockout
<i>RIM-BP2^{-/-}</i>	Genotypische Bezeichnung für RIM-BP2 Knockout
<i>RIM-BP2^{+/+}</i>	Genotypische Bezeichnung für RIM-BP2 Wildtyp
RNA	Ribonukleinsäure
RRP	<i>readily releasable pool</i>
R_s	<i>series resistance</i> , Serienwiderstand
SEM	<i>standard error of the mean</i> , Standardfehler des Mittelwertes
SGN	Spiralganglion-Neuron
SH3	<i>Src homology domain</i>
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor</i>
STED	<i>stimulated emission depletion</i>
SV	Synaptisches Vesikel
TEA-Cl	Tetraethylammoniumchlorid
V_{half}	Halb-maximales Aktivierungspotenzial
V_m	Membranpotenzial
V_{rev}	Umkehrpotenzial
<i>vs.</i>	Versus
ZNS	Zentrales Nervensystem
ΔC_m	Änderung der Membrankapazität
Ø	Durchmesser

1 Einleitung

1.1 Das periphere auditorische System: Außen-, Mittel- und Innenohr

Hören basiert auf der Fähigkeit zur Umwandlung physikalischer Druckwellen in elektrische Signale, die anschließend über sensorische Bahnen an das zentrale Nervensystem weitergeleitet werden. Die Wahrnehmung akustischer Signale ermöglicht uns die Orientierung in der Umwelt, die Erkennung von Gefahrenquellen und ist ein zentraler Bestandteil der verbalen Kommunikation. Das Ohr ist das periphere Hörorgan der Säugetiere und daher eines der wichtigsten Sinnesorgane für die Perzeption äußerer Umweltreize.

Das Ohr der Säugetiere wird anatomisch und funktionell in drei Bereiche untergliedert (Abbildung 1A). Das Außenohr (*auris externa*) – der „Schalltrichter“, das Mittelohr (*auris media*) – der „Schallverstärker“ und das Innenohr (*auris interna*) – der „Schallsensor“. Über die Ohrmuschel (*auricula auris*) werden die Schallwellen aus der Umgebung gesammelt und über den äußeren Gehörgang (*meatus acusticus externus*) auf das Trommelfell (*membrana tympani*) geleitet, welches das Außenohr vom Mittelohr trennt. Das Trommelfell wird durch die Schallwellen aus dem äußeren Gehörgang in Schwingung versetzt und überträgt diese auf die Gehörknöchelchen – Hammer (*malleus*), Amboss (*incus*) und Steigbügel (*stapes*) – des Mittelohrs. Diese wirken als „Schallverstärker“ und ermöglichen die Impedanz-Anpassung beim Übergang der Schallwelle aus der Luft in das flüssigkeitsgefüllte Innenohr. Das Innenohr beherbergt im cochleären Teil des Labyrinths das eigentliche sensorische Hörorgan, denn erst hier erfolgt die Umwandlung der physikalischen Druckwelle in ein elektrisches Signal, welches über die Hörbahn zur primären Hörrinde im Cortex geleitet wird.

Das cochleäre Labyrinth enthält die spiralig gewundene Cochlea („Hörschnecke“). Die Cochlea wird durch die Reissnersche Membran und die Basilarmembran in drei flüssigkeitsgefüllte Kompartimente unterteilt (Abbildung 1B): Die *scala media* liegt in der Mitte. Sie ist mit kaliumreicher Endolymph-Flüssigkeit gefüllt und enthält das Corti-Organ. Oberhalb der *scala media* befindet sich – durch die Reissnersche Membran getrennt – die *scala vestibuli* und darunter befindet sich – durch die Basilarmembran getrennt – die *scala tympani*. Die mechanische Kopplung von Mittelohr und Innenohr erfolgt an der Basis der Cochlea über das ovale Fenster, an welches die *scala vestibuli* grenzt. Die *scala vestibuli* und *scala tympani* sind beide mit Perilymph-Flüssigkeit gefüllt und am Apex der Cochlea über das Helicotrema miteinander verbunden. Wenn Schallwellen zur Vibration des ovalen Fensters führen, kommt es zu einer periodischen Verschiebung der nicht-komprimierbaren Flüssigkeit in der Cochlea und es entsteht eine Wanderwelle. Diese bewegt sich von basal nach apikal in der Cochlea fort und induziert Schwingungen der flexiblen Basilarmembran.

Die Beschaffenheit der Basilmembran ändert sich kontinuierlich zwischen der Cochlea Basis und dem Apex, sodass durch die unterschiedlichen Resonanz-Eigenschaften eine Frequenz-Tonotopie entsteht. Somit erzeugen hohe Frequenzen an der Basis und niedrige Frequenzen am Apex der Cochlea ihre maximale Schwingungs-Amplitude.

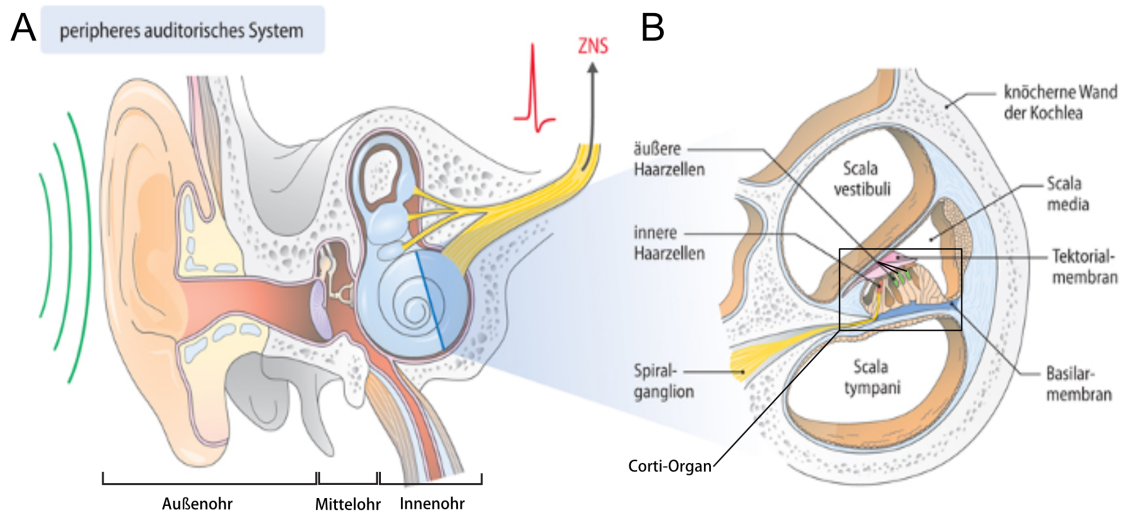


Abbildung 1: Das periphere auditorische System

[A] Das periphere auditorische System besteht aus dem Außenohr („Schalltrichter“), dem Mittelohr („Schallverstärker“) und dem Innenohr („Schallsensor“). Schallwellen aus der Luft werden in das flüssigkeitsgefüllte Innenohr geleitet, wo die Umwandlung der physikalischen Druckwellen in elektrische Signale stattfindet, die anschließend über sensorische Bahnen an das zentrale Nervensystem (ZNS) weitergeleitet werden. **[B]** Die Cochlea wird durch die Reissnersche Membran und die Basilmembran in drei flüssigkeitsgefüllte Kompartimente unterteilt: Die *scala vestibuli*, *scala media* und *scala tympani*. Innerhalb der *scala media*, der Basilmembran aufliegend, befindet sich das Corti-Organ mit den inneren und äußeren Haarzellen. **[A – B]** Die Abbildung wurde nach Moser und Zenner 2019 modifiziert.

1.2 Das Corti-Organ und Physiologie der inneren Haarzellen

Das Corti-Organ (Abbildung 1B und Abbildung 2A) ist das Sinnesepithel des Innenohrs und liegt der gesamten Basilmembran auf. Im Corti-Organ befinden sich neben verschiedenen Stützzellen, wie den Pfeilerzellen und Phalangenzellen, die unter anderem der zellulären Integrität und Homöostase dienen, die äußeren Haarzellen und die inneren Haarzellen (IHZ). Die äußeren Haarzellen sind in drei Reihen angeordnet und erfüllen die Funktion eines cochleären „Schallverstärkers“. Die IHZ sind in einer Reihe angeordnet und erfüllen als sekundären Sinneszellen die Funktion eines „Schallsensors“, denn sie sind in der Lage, das akustische Signal in den neuronalen Code zu transformieren. Für die Namensgebung der Haarzellen sind die apikal verankerten Stereozilien (Abbildung 2B) verantwortlich, die wie „Haare“ in die *scala media* ragen. Die Stereozilien sind symmetrisch in hexagonalen Reihen angeordnet und miteinander über Tip-links verbunden. Sie werden durch die schallinduzierte, mechanische Schwingung der Basilmembran über die Tectorialmembran ausgelenkt.

Dabei öffnen sich mechano-sensitive MET-Kanäle, welche eine hohe Leitfähigkeit für Kalium besitzen (Howard und Hudspeth 1988; Assad et al. 1991). Die Ionenzusammensetzung der *scala media* entspricht dem kaliumreichen intrazellulären Milieu der sensorischen Haarzellen, was bezüglich der Kalium Ionen zu einer chemischen Potenzialdifferenz von 0 mV (Nernst Potenzial) führt. Jedoch herrscht durch das positive endocochleäre Potenzial (ca. +80 mV), das durch die unterschiedliche Ionenkomposition der Endolymphe und der Perilymphe entsteht und dem negativ geladenen Lumen der IHZ (Ruhemembranpotenzial von ca. -45 mV) ein starker elektrischer Gradient (ca. 125 mV), der als Antriebskraft für den Kaliumeinstrom in die IHZ wirkt. Durch den Kaliumeinstrom entsteht in der IHZ ein positives Rezeptorpotenzial, welches sich vom apikalen Pol entlang der Plasmamembran nach basal ausbreitet, wo sich die afferenten Bändersynapsen (*ribbon* Synapsen) befinden (Abbildung 2B).

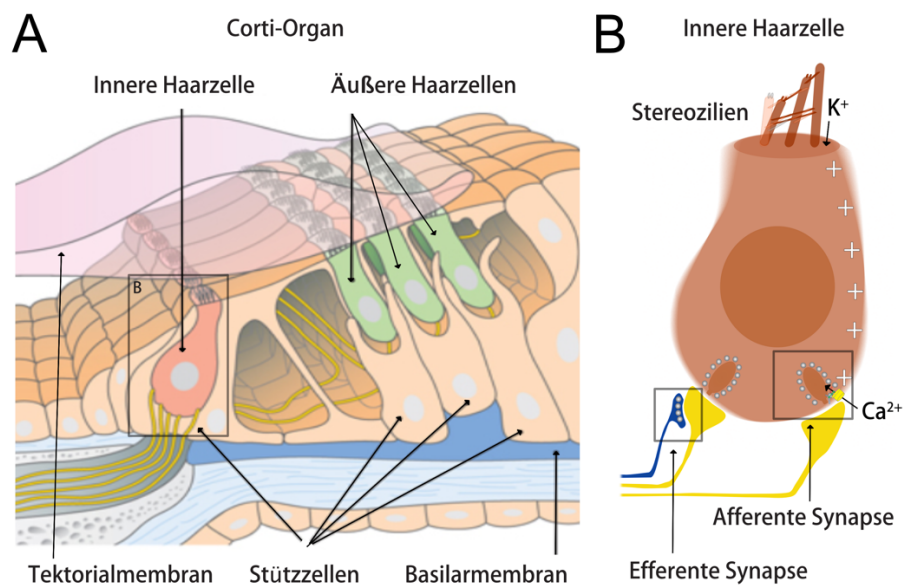


Abbildung 2: Das Corti-Organ und die innere Haarzelle

[A] Das Corti-Organ ist das Sinnesepithel des Innenohrs, liegt der Basilarmembran auf, ist von der Tektorialmembran bedeckt und beinhaltet neben Stützzellen die äußeren und inneren Haarzellen (Box). Die Abbildung wurde nach Moser und Zenner 2019 modifiziert. **[B]** Die Stereozilien am Apex der inneren Haarzellen werden durch mechanische Schwingungen ausgelenkt. Der dadurch induzierte Einstrom von Kalium (K⁺) induziert ein positives Rezeptormembranpotenzial (+). Dieses breitet sich zur Basis aus und induziert dort die Öffnung spannungsabhängiger Ca²⁺-Kanäle an den Bändersynapsen. Diese bilden afferente Synapsen zu den Spiralganglion Neuronen (gelb). Die Synapsenköpfchen der Spiralganglion Neurone wiederum werden von efferenten Neuronen der lateralen Olive (blau) innerviert und moduliert (efferente Synapse).

Ein wichtiger Bestandteil der Bändersynapsen sind spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle (Ca_v), die sich bei akustischer Stimulation durch das positive Rezeptorpotenzial in der IHZ öffnen. Das in die IHZ einströmende Ca²⁺ löst die Exozytose, also die Fusion der synaptischen Vesikel (SV) mit der präsynaptischen Plasmamembran aus, wodurch Glutamat aus den SV in den synaptischen Spalt gelangt. Dieses diffundiert durch den synaptischen Spalt und löst in den postsynaptischen Endigungen der Spiralganglion-Neurone (SGN) exzitatorische postsynaptische Potentiale (EPSP) und schließlich Aktionspotenziale (AP) aus.

Die Synapse zwischen IHZ und SGN wird als afferente Synapse (Abbildung 2B) bezeichnet. Die SGN bilden den *Nervus (N.) cochlearis* (*N. vestibulocochlearis*, VIII Hirnnerv), von dem aus die auditorischen Information schließlich über verschiedene Kerngebiete und Fasertrakte im Rahmen der Hörbahn zur primären Hörrinde im zentralen Nervensystem (ZNS) geleitet wird. Zusätzlich projizieren efferente auditorische Fasern aus dem oberen, lateralen Olivenkern zum einen auf die äußeren Haarzellen, wo sie die Verstärkeraktivität regulieren, und zum anderen auf die Synapsenköpfchen der SGN an der IHZ, wo sie eine efferente Synapse bilden und die afferente synaptische Aktivität modulieren (Abbildung 2B).

Experimentell ermöglichen elektrophysiologische *patch-clamp* Experimente an IHZ (Moser und Beutner 2000) sowohl die Messung von spannungsabhängigem Ca^{2+} -Einstrom, als auch der dadurch ausgelösten Exozytose. Bei der Exozytose werden zwei kinetische Komponenten unterschieden: Der „*readily releasable pool*“ (RRP) besteht aus einem Reservoir an fusionskompetenten SV, das den Bändersynapsen bei einer Stimulation sofort zur Verfügung steht und dessen Exozytose einer schnellen Kinetik folgt (Moser und Beutner 2000). Experimentell wird der RRP durch kurze Depolarisationen (bis 20 ms) der IHZ komplett freigesetzt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Exozytose des RRP durch die Zugabe des langsamen Ca^{2+} -Chelators EGTA nur wenig beeinflusst wird (Moser und Beutner 2000; Brandt et al. 2005), was auf eine enge räumliche Nähe der Ca^{2+} -Kanäle und der SV schließen lässt. Tatsächlich stehen die $\text{Ca}_v1.3$ Kanäle mit einer Entfernung von 15 – 17 nm (Pangrsic et al. 2015) in engem Kontakt mit den SV: Es handelt sich hier also um eine „ Ca^{2+} -Nanodomäne“ um den $\text{Ca}_v1.3$ Kanal, die die Freisetzung der fusionskompetenten SV des RRP bestimmt, und die sich durch einen linearen Zusammenhang zwischen Ca^{2+} -Einstrom und Exozytose auszeichnet. Dies ist ein wichtiger Faktor für die zeitliche Präzision der Exozytose und der synchronen synaptischen Aktivität. Bei längeren Depolarisationen (> 20 ms) ist die Kinetik der Exozytose vom Wiederauffüllen des RRP abhängig und dadurch deutlich langsamer (Moser und Beutner 2000; Schnee et al. 2005; Goutman und Glowatzki 2007; Meyer et al. 2009; Neef et al. 2009).

1.3 Molekulare Komposition der Bändersynapse

Die Kodierung der akustischen Information in den IHZ ist von höchster Präzision, höchster Geschwindigkeit und ständiger Bereitschaft zur Informationsübertragung. Da die IHZ mit ihren Bändersynapsen die erste Station der Hörbahn bildet, ist besonders hier ein hochspezialisiertes und robustes System notwendig, um diesen hohen Anforderungen zu entsprechen.

Daher folgt die Bändersynapse einem Aufbau, der von dem konventioneller Synapsen des ZNS abweicht. Ein Unterschied zu konventionellen Synapsen des ZNS ist die Ultrastruktur der Bändersynapsen. Im Elektronenmikroskop ist eine prominente elektronendichte oval- bis längliche Struktur – das sogenannte synaptische Band (Abbildung 3A) – zu erkennen, dessen Hauptbestandteil das Strukturprotein CtBP2/RIBEYE ist (Schmitz et al.

2000; Khimich et al. 2005; Maxeiner et al. 2016; Becker et al. 2018; Jean et al. 2018). Die Bänder sind von SV umgeben und über das Gerüstprotein Bassoon (Dick et al. 2003; Khimich et al. 2005; tom Dieck et al. 2005) mit der Plasmamembran in der aktiven Zone (AZ) verankert (Abbildung 3B). Die AZ ist ein Bereich in der präsynaptischen Plasmamembran an der Basis der Bänder, in dem die Exozytose stattfindet und in dem sich die spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle vom $\text{Ca}_v1.3$ L-Typ befinden, dessen Mutation bei Mensch und Maus zum Hörverlust führt (Platzer et al. 2000; Brandt et al. 2003; Dou et al. 2004; Mansergh et al. 2005; Baig et al. 2011). Zusätzlich zur Morphologie unterscheidet sich auch die Physiologie der IHZ Bändersynapse von der konventioneller ZNS Synapsen. Während an den IHZ Bändersynapsen der Maus das Vesikel-Priming und die Exozytose scheinbar unabhängig von Munc-13, CAPS (Vogl et al. 2015) und neuronalen SNARE-Proteinen (Nouvian et al. 2011) abläuft, spielt in IHZ Otoferlin als unkonventioneller Ca^{2+} -Sensor für die Exozytose eine wichtige Rolle (Pangrsic et al. 2012). Im Menschen lösen Mutationen im Otoferlin-Gen eine autosomal rezessiv vererbte auditorische Synaptopathie DFNB9 aus (Yasunaga et al. 1999; Rodríguez-Ballesteros et al. 2003; Varga et al. 2003).

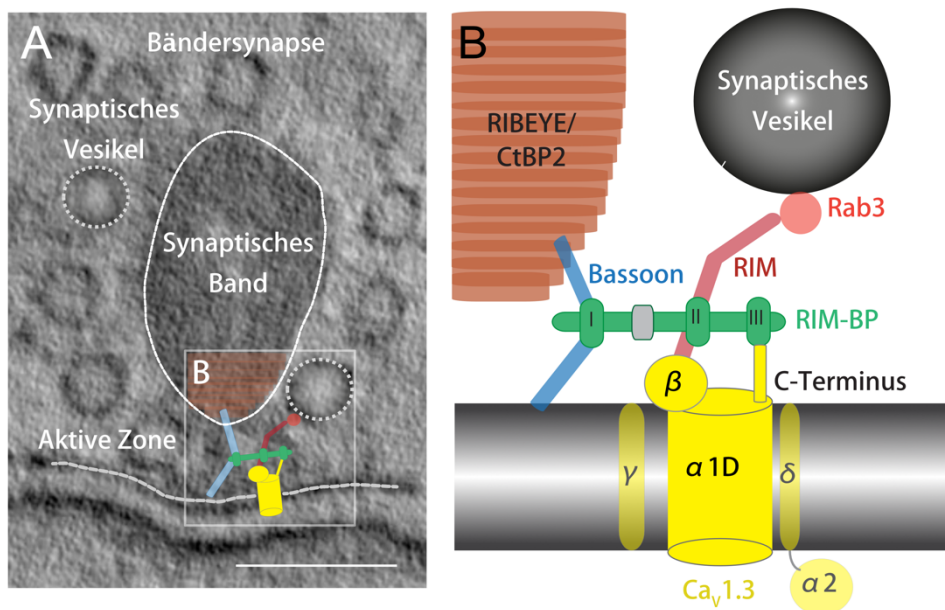


Abbildung 3: Bändersynapse

[A] Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Bändersynapsen (*ribbon* Synapse). Das für die Bändersynapsen namensgebende synaptische Band (dünne weiße Linie) befindet sich an der präsynaptischen aktiven Zone (dicke graue Linie), hat eine elektronendichte oval-rund bis längliche Struktur und ist von synaptischen Vesikeln (grau gestrichelter Kreis) umgeben. Maßstabsbalken: 100 nm. Box: Schematische, nicht-maßstabgetreue Darstellung einiger molekularer Komponenten der aktiven Zone von IHZ in [B]. Die Abbildung wurde nach Krinner et al. 2017 modifiziert. **[B]** Schematische Darstellung ausgewählter Proteinkomponenten der IHZ Bändersynapse. Hauptbestandteil ist das synaptische Band (orange), der zum Großteil aus RIBEYE/CtBP2 besteht (orange) und über Bassoon (blau) an der Plasmamembran (grau) verankert ist. Spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle vom $\text{Ca}_v1.3$ L-Typ (gelb) interagieren sowohl mit RIM (dunkelrot), als auch RIM-BP (grün). Synaptische Vesikel (Kreis) sind über Rab3 (hellrot), RIM und RIM-BP mit spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle (gelb) verbunden. RIM-BP (grün) im Zentrum der Abbildung bindet mit der N-terminalen SH3 Domäne (I) an Bassoon (blau), mit den zwei C-terminalen SH3 Domänen (II, III) bindet es sowohl Ca^{2+} -Kanäle (gelb) als auch RIM (rot). Die Abbildung wurde nach Krinner 2018 modifiziert.

1.4 RIM-BPs

Ein potenzieller und aus mehreren Gründen interessanter Kandidat für die funktionelle Integrität der IHZ Bändersynapse ist RIM-BP1. RIM-BP1 ist Teil der RIM-BPs Proteinfamilie, welche aus 3 Mitgliedern (RIM-BP 1-3) besteht. RIM-BP2 wurde bereits in vergangenen Arbeiten als funktionell und strukturell wichtige Komponente an der IHZ Bändersynapse identifiziert (Krinner et al. 2017; Ortner et al. 2020). RIM-BP2 ist ein zentraler Bestandteil der präsynaptischen AZ von IHZ Bändersynapsen (Abbildung 3B) und reguliert dabei die Anzahl und räumliche Organisation der synaptischen Ca^{2+} -Kanäle wie auch die Exozytose, unter anderem durch einen positiven Effekt auf die Wiederauffüllung des RRP (Krinner et al. 2017). Die signifikant reduzierte Exozytose in RIM-BP2 Mausmutanten lässt sich zum einen durch den um etwa 40 % reduzierten synaptischer Ca^{2+} -Einstrom erklären, besteht aber zusätzlich in einem Defizit in der Wiederauffüllen des RRP (Krinner et al. 2017). Diese Funktionen von RIM-BP2 lassen sich strukturell begründen, denn durch diverse Interaktionsdomänen sind RIM-BPs in der Lage, sowohl direkt mit Ca^{2+} -Kanälen, als auch indirekt mit SV zu interagieren (Abbildung 3B). Alle 3 RIM-BPs sind strukturell homolog aufgebaut und verfügen neben einer Fibronectin Typ II Domäne über eine N-terminale und zwei C-terminale SH3 Domänen (*Src homology domains*). Über ihre N-terminale SH3 Domäne interagieren RIM-BPs mit Bassoon (Davydova et al. 2014) und über ihre C-terminalen SH3 Domänen interagieren sie direkt mit dem C-Terminus der $\text{Ca}_v\alpha 1$ Ca^{2+} -Kanal Untereinheit von P/Q-, N-, and L-Typ Ca^{2+} -Kanälen und RIMs, welche über Rab3 direkt mit den SV verbunden sind (Abbildung 3B) (Wang et al. 2000; Hibino et al. 2002; Kaeser et al. 2011; Acuna et al. 2015; Ortner et al. 2020). RIM-BPs haben dadurch möglicherweise überlappende oder gar synergistische Funktion mit RIMs und Bassoon. Ähnlich wie RIM-BP2 Mausmutanten (Krinner et al. 2017), zeigten sowohl Bassoon (Khimich et al. 2005; Frank et al. 2010), als auch RIM2 (Jung et al. 2015) Mausmutanten an der IHZ Bändersynapse Defizite in der Organisation und Anzahl der synaptischen Ca^{2+} -Kanäle. Dabei interagiert RIM zum einen direkt mit der $\text{Ca}_v1.3\alpha$ und $-\beta$ Untereinheit der Ca^{2+} -Kanäle (Coppola et al. 2001; Kiyonaka et al. 2007; Gebhart et al. 2010; Kaeser et al. 2011), zum anderen besteht zu den Ca^{2+} -Kanälen eine indirekte Verbindung über RIM-BPs (Hibino et al. 2002, S. 200; Kaeser et al. 2011; Liu et al. 2011). Auch Bassoon interagiert mit den Ca^{2+} -Kanälen über RIM-BPs nur indirekt (Davydova et al. 2014). RIM-BPs fungieren also als zentrale Interaktions-Plattform für diverse Proteine der AZ mit den Ca^{2+} -Kanälen. Diese zentrale Rolle von RIM-BPs zeigte sich auch an anderen Synapsen. In *drosophila melanogaster* führte der Verlust von DRPB (*drosophila melanogaster* RIM-BP) an der Neuromuskulären Endplatte zu extremen strukturellen Veränderungen, einer drastischen Reduktion der Ca^{2+} -Kanäle, einer Störung in der Kopplung zwischen Ca^{2+} -Kanäle und SV und dem Wiederauffüllen des RRP, was sich letztlich durch eine starke Reduktion der Vesikel-Fusionswahrscheinlichkeit äußerte (Liu et al. 2011; Müller et al. 2015; Petzoldt et al. 2020). Ähnliches gilt für die Bändersynapsen in der Retina, wo die separate und kombinierte Deletion von RIM-BP1/2 sowohl eine Reduktion der synaptischen L-Typ Ca^{2+} -Kanäle, als

auch eine Störung in der Kopplung zwischen Ca^{2+} -Kanäle und SV und dem Wiederauffüllen des RRP zur Folge hatte (Luo et al. 2017). In Synapsen des Hippocampus und der Held'schen Calyx hatte der Verlust von RIM-BPs zwar keinen Einfluss auf die Anzahl der P/Q- und N-Typ Ca^{2+} -Kanäle, jedoch wurde auch hier eine Störung in der Kopplung zwischen Ca^{2+} -Kanäle und SV (Acuna et al. 2015; Grauel et al. 2016) und dem Wiederauffüllen des RRP in der Held'schen Calyx beobachtet (Acuna et al. 2015).

Es bleibt nun zu klären, ob RIM-BP1 auch an der IHZ Bändersynapse eine zentrale Funktion einnimmt und ob synergistische Effekte zwischen RIM-BP1 und -2 im peripheren auditorischen System eine Rolle spielen. In dieser Arbeit wurden (1) fluoreszenzbasierte Expressionsanalysen von RIM-BP1 in IHZ der Maus mittels Immunhistochemie, RNAscope[®] Technik und konfokaler Mikroskopie durchgeführt und (2) in einer RIM-BP1/2 Doppelknockout-Mauslinie elektrophysiologische *patch-clamp* Technik angewendet, um den Einfluss von RIM-BP1 sowohl auf den spannungsabhängigen Ca^{2+} -Einstrom, als auch die Exozytose der cochleären IHZ zu testen. (3) Zusätzlich wurden verschiedene Hörtests durchgeführt, um den Effekt des RIM-BP1/2 Verlusts für das auditorische System *in vivo* beurteilen zu können. Die Daten der RIM-BP1/2 Doppelknockout-Mauslinie wurden in Krinner et al. 2021 publiziert und mit den Daten der RIM-BP2 Knockout Mauslinie aus Krinner et al. 2017 verglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Die RIM-BP1/2 Doppelknockout-Mauslinie wurde von Grauel und Kollegen zusammen mit genOway durch homologe Rekombination generiert (Grauel et al. 2016). Durch Deletion von Exons 23 – 25 (RIM-BP1) und Exon 17 (RIM-BP2) aus *C57BL/6* Mäusen wurden RIM-BP1 (*RIM-BP1^{-/-}*) und RIM-BP2 (*RIM-BP2^{-/-}*) Knockout-Mäuse generiert, welche zur Generierung von RIM-BP1/2 Doppelknockout-Mäusen (*RIM-BP1/2^{-/-}*) verpaart wurden (Grauel et al. 2016). Die Genotypen wurde durch Polymerasekettenreaktion (PCR) mit den publizierten Primern verifiziert (Grauel et al. 2016). RIM-BP1/2 Doppelknockout-Mäuse beider Geschlechter wurden postnatal, im Alter zwischen 14 – 16 Tagen (p14 – p16) für *patch-clamp* Experimente und für Immunhistochemie und Immunfluoreszenzmikroskopie und zwischen p60 – p65 für die Messung der akustisch evozierten Potenziale (AEP) und der Distorsionsprodukte otoakustischer Emissionen (DPOAE) verwendet. *C57BL/6* Mäuse zwischen p14 – p16 wurden für RNAscope[®] Experimente, Immunhistochemie und Immunfluoreszenz-mikroskopie verwendet. Alle Experimente wurden entsprechend der nationalen Leitlinien für tierschutzgerechte Haltung und Forschung durchgeführt und wurden durch den Tierschutzbeauftragten der Universität Göttingen und das Niedersächsische Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) genehmigt.

2.2 Chemikalien

Amphotericin B wurde von Calbiochem bezogen, alle anderen Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich bezogen. Cs-Glukonat wurde aus CsOH and D-Glukonat hergestellt.

2.3 Präparation des Corti-Organs

Die Mäuse wurden nach einer CO₂ Narkose enthauptet. Die Haut, der Schädelknochen und das Gehirn wurden durch einen Mediansagittalschnitt mit einer feinen Schere geteilt und beide Hälften wurden in eine Petrischale mit Salzlösung nach Hanks mit 10 mM HEPES (in mM: 142 NaCl, 5,4 KCl, 1,0 MgCl₂, 0,5 MgSO₄, 0,1 CaCl₂, 3,4 L-Glutamin, 11 D-Glukose, 10 HEPES, pH 7,3, mit 1 M NaOH titriert, Osmolarität 300 mOsm/l) gegeben. Mit Pinzetten wurden anschließend unter einem Seziernmikroskop jeweils die Gehirnhälften aus dem Schädel entfernt und die Cochleae aus den Schläfenbeinen herausgelöst. Feine Pinzetten wurden verwendet, um die knöcherne Kapsel der Cochlea vom Apex bis zur mittleren Windung zu öffnen, vorsichtig die *stria vascularis* abzuziehen und die apikale Windung des Corti-Organs vom Modiolus zu lösen.

2.4 *Patch-clamp* Experimente

Das Corti-Organ wurde mittels einer Pasteur Pipette in die Messkammer unter das Mikroskop (BX50WI Olympus, Hamburg, Deutschland; 60-fach Vergrößerungs-Objektiv: LUMPlan, NA 0,9, Olympus, Hamburg, Deutschland) transferiert. Dort wurde es durch ein Nylon-Netz mit den Stereozilien nach oben fixiert und mit modifizierter Ringer-Lösung (in mM: 110 NaCl, 35 TEA-Cl, 2,8 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 NaOH-HEPES, 11,3 D-Glukose, pH 7,3, mit 1 M NaOH titriert, Osmolarität 300 mOsm/l) perfundiert (0,5 – 1 ml/Minute). Mit einem piezoelektrischen Mikromanipulator (MP-285, Sutter Instruments Company, Novato, USA) wurden die Glaspipetten in der Messkammer navigiert. Dadurch konnte mit verschieden weit geöffneten Glaspipetten (Sodalime-Glas Kapillaren: 1,5 x 0,15 x 80 mm, Hilgenberg, Germany, Puller: PA-10 E.S.F. Electronic, Göttingen, Germany) die Tectorialmembran abgesaugt (\varnothing 20 – 30 μ m) und anschließend die äußeren Haarzellen (\varnothing 2 – 5 μ m), Pfeilerzellen (\varnothing 2 – 5 μ m), und Phalangenzellen (\varnothing 1 μ m) abgetragen werden, sodass die Plasmamembran der IHZ für die *patch-clamp* Pipette zugänglich ist.

***Patch-clamp* Messungen:** Der *patch-clamp* Messplatz wurde durch einen Faraday'schen Käfig abgeschirmt und durch einen hydraulischen Tisch abgefedert (TMC, Peabody, USA). Eine MPCU-3 Pumpe (Lorenz Messgerätebau, Kathlenburg-Lindau, Deutschland) wurde verwendet, um das Flüssigkeitsniveau in der Messkammer konstant zu halten und den Pipetten-Druck zu kontrollieren. *Patch-clamp* Messungen an IHZ wurden wie in Moser und Beutner 2000 beschrieben durchgeführt. Dafür wurde ein EPC-10 USB-Verstärker (HEKA Elektronik, Lambrecht, Germany) gesteuert durch die Patch-Master Software (HEKA Elektronik, Lambrecht, Germany) verwendet. Für *patch-clamp* Messungen wurden Borsilikat-Glas Pipetten (GB150-8P 0,86 x 1,50 x 80 mm, Science Products, Hofheim, Deutschland) verwendet, welche mit dem Sutter P-97 Flaming/Brown Micropipette Puller (Sutter Instruments Company, Novato, USA) in Form gezogen und anschließend mit einer maßgearbeiteten *mikroforge* hitze-poliert wurden. Für die *whole-cell patch-clamp* Messungen wurden die Pipetten mit Intrazellulärlösung (in mM: 130 Cs-Glukonat, 10 TEA-Cl, 10 4-AP, 10 HEPES, 1 MgCl₂, 300 μ g/ml Amphotericin B in 0,6 % DMSO, pH 7,2 mit konzentrierter HCl titriert, Osmolarität 290 mOsm/l) gefüllt. Mit einem Widerstand von 4,5 – 6.0 M Ω wurden diese unter Überdruck (2,5 cm H₂O) der IHZ-Membran angenähert, um nach der Druckentlastung ein *gigaseal* zwischen Membran und Pipette zu formen. Das über die Intrazellulärlösung applizierte Amphotericin B wurde benutzt, um innerhalb weniger Minuten die Membran der IHZ für monovalente Ionen zu perforieren und damit den für die *whole-cell patch-clamp* Messungen nötigen elektrischen Zugang zum Intrazellulärraum der IHZ herzustellen. Das Haltepotenzial der IHZ wurde in der Spannungs-klemme (*voltage-clamp*) auf -84 mV (korrigiert für *liquid junction potential*, LJP, Diffusionspotenzial) eingestellt. Die Kapazitätskompensation für die schnellen transienten Ströme, welche hauptsächlich durch die Beladung der Pipette entstehen, wurde über die automatische Patch-Master Software C_{fast} Kompensationsfunktion durchgeführt.

Die Kapazitätskompensation für die während der Perforation zunehmenden langsamen transienten Ströme, welche durch die Beladung der IHZ Membran entstehen, wurden über die automatische Patch-Master Software C_{slow} Kompensationsfunktion durchgeführt. Alle Ströme wurden durch eine Leckstrom-Korrektur mittels p/10 Protokoll korrigiert, mit 100 kHz aufgenommen und mit 2,9 kHz tiefpassgefiltert.

Messung der Membrankapazität: Die durch Exozytose hervorgerufenen Änderungen der IHZ Membrankapazität (ΔC_m) wurde wie in Moser und Beutner 2000 beschrieben, durch die Lindau-Neher Technik gemessen (Lindau und Neher 1988). Dafür wurden IHZ im Abstand von 30 – 60 s für unterschiedliche Zeit durch elektrische Depolarisation (-14 mV, LJP korrigiert) stimuliert. ΔC_m wurde anschließend durch die über 400 ms gemittelte C_m vor und nach der IHZ Depolarisation (100 ms post-Stimulus ausgenommen), ermittelt. Jede Depolarisationsdauer wurde pro IHZ 2 – 3-mal getestet, um einen Mittelwert pro Stimulus für jede IHZ zu erhalten.

Messung der Kalziumströme und deren Spannungsabhängigkeit: Um die Abhängigkeit zwischen Kalziumströmen (I_{Ca}) und der Membranspannung (V) (IV , *current-voltage relationship*, Strom-Spannungs-Kurve) zu messen, wurden IHZ für 10 ms in 5 mV Schritten von -100 mV bis 30 mV depolarisiert. Die letzten 8 ms der evozierten Kalziumströme wurden für die Berechnung der Spannungsabhängigkeit benutzt:

$$G(V) = \frac{I_{Ca}}{(V - V_{rev})}$$

Dafür wurde zunächst für alle Depolarisationen die Leitfähigkeit (G) berechnet und gegen die Spannung (V) abgebildet (*fractional activation curves*). Das Umkehrpotenzial (V_{rev}) wurde berechnet, indem eine Ausgleichsgerade an die Messpunkte zwischen 6 – 26 mV angepasst wurde und zu dem Punkt extrapoliert wurde, an dem kein Strom mehr fließt. Alle Kurven wurden zur maximalen Leitfähigkeit (G_{max}) normalisiert (G_n , linear zwischen -20 bis 10 mV) und eine Boltzmann Gleichung als Fitfunktion angepasst:

$$G_n(V) = \frac{G_{n,max}}{1 + e^{\frac{V_{half} - V}{k}}}$$

In der Gleichung ist V_{half} (halb-maximales Aktivierungspotenzial) die Membranspannung, bei der die Hälfte der Kalziumkanäle geöffnet sind und k der Steigungsfaktor der spannungsabhängigen Kalzium-Kanalaktivierung.

Analyse und Statistik: Die Auswertung der *patch-clamp* Daten und die statistischen Tests wurden mit der Igor Pro Software (Wavemetrics, Lake Oswego, USA) durchgeführt. Das Vorliegen einer Normalverteilung der Datenpunkte wurde durch den Jarque-Bera-Test ermittelt. Eine Varianzanalyse wurde mit dem F-Test durchgeführt. Wenn keine Normalverteilung oder ungleicher Varianzen vorlagen, wurde der Wilcoxon-Rangsummentest zur Überprüfung der Nullhypothese, ansonsten der Zweistichproben- t -Test verwendet. Bei Vergleichen von mehr als zwei Datensätzen wurde eine one-way ANOVA mit konsekutivem *post-hoc* Tukey's Test verwendet.

2.5 Immunhistochemie und Fluoreszenzmikroskopie

Die Immunhistochemie erfolgte wie in Khimich et al. 2005 beschrieben. Dafür wurde die apikale Windung des Corti-Organs präpariert (2.3 Präparation des Corti-Organs) mit 4 % Formaldehyd in *phosphate-buffered saline* (PBS, phosphatgepufferte Salzlösung) für 10 Minuten auf Eis fixiert, dreimal für 10 Minuten mit PBS gewaschen und schließlich 1 Stunde in *goat serum dilution buffer* (GSDB, Ziegenserum): 16 % Ziegenserum und in mM: 450 NaCl, 0,3 % Triton X-100, 20 Phosphat-Puffer, pH 7,4) geblockt. Die Corti-Organe wurden anschließend in mit GSDB verdünnten Primärantikörpern (Tabelle 1) in einer feuchten Kammer bei 4 °C über Nacht inkubiert.

Tabelle 1: Primäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Spezies	Hersteller
anti-Bassoon	1:500	Meerschweinchen	Synaptic Systems
anti-Calretinin (CR7697)	1:1000	Kaninchen	Swant
anti-CtBP2	1:200	Maus	BD Biosciences
anti-RIM-BP1	1:200	Hase	Synaptic Systems
Synapsin1/2	1:500	Meerschweinchen	Synaptic Systems

Anschließend wurden die Corti-Organe dreimal für 10 Minuten mit Wasch-Puffer (in mM: 450 NaCl, 20 Phosphat-Puffer, 0,3 % Triton X-100) gewaschen und in mit GSDB verdünnten Sekundärantikörpern (Tabelle 2) in einer lichtgeschützten, feuchten Kammer für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Tabelle 2: Sekundäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Spezies	Hersteller
AlexaFluor647 anti-Hase	1:200	Ziege	Invitrogen
Star580 anti-Maus	1:200	Ziege	Abberior Instruments GmbH
Star635P anti-Meerschweinchen	1:200	Ziege	Abberior Instruments GmbH
Star470spx anti-Hase	1:200	Ziege	Abberior Instruments GmbH

Zuletzt wurden die Corti-Organen dreimal für 10 Minuten mit Wasch-Puffer und einmal für 10 Minuten mit 5 mM Phosphat-Puffer gewaschen, bevor sie mit den Stereozilien nach oben auf einen Mikroskop-Objektträger platziert, und mit Eindeck-Medium (Mowiol) und einem Deckglas bedeckt wurden.

Die konfokale Mikroskopie wurde an einem konfokalen/STED Mikroskop (Abberior Instruments, Göttingen, Germany) durchgeführt, welches mit einem 100-fach Ölimmersionsobjektiv (1,4 NA, Olympus) und 488 nm, 561 nm und 640 nm Anregungslasern ausgestattet war. Alle Proben wurden parallel vorbereitet und mikroskopiert, sodass die Mikroskop-Einstellungen und Laserstärken vergleichbar waren. Die Bildanalyse erfolgte mit NIH ImageJ (Schneider et al. 2012).

2.6 RNAscope®

Das RNAscope® Experiment wurde mit Unterstützung durch Dinah Burfeind und Dr. Christian Vogl durchgeführt, um die Expression von RIM-BP1 in einzelnen IZH zu analysieren. Cochleae von *C57BL/6* Mäusen im Alter zwischen p14 – 16 wurden in 4 % Formaldehyd (in DEPC-behandeltem PBS) für 2 Stunden auf Eis fixiert. Die apikalen Windungen der Cochlea wurden in DEPC-behandeltem PBS präpariert (2.3 Präparation des Corti-Organen). Diese wurden anschließend mit einer Ethanol-Reihe (1x 50 % 5 Minuten, 1x 70 % 5 Minuten, 2x 100 % 5 Minuten) dehydriert und getrocknet. Das RNAscope® Experiment wurde nach Herstellerangaben durchgeführt (RNAscope® *Multiplex Reagent Kit* User Manual, 320293-USM, ACDbio): (1.) Inkubation mit *Protease III* für 30 Minuten bei 40 °C, (2.) Zweimaliges Waschen mit DEPC-behandeltem, autoklaviertem Wasser, (3.) Inkubation mit RNAscope® Sonden (RIM-BP1-C1: Anfertigung von ACDbio auf Anfrage, bindet die Region 5565-5927 von RIM-BP1 (NM_172449.2), Otoferlin-C2: ACDbio Katalog-Nummer 485671-C2; 1:50 Verdünnung, 50 – 70 µl) für 2 Stunden bei 40 °C, (4.) Zweimaliges Waschen mit Wasch-Puffer, (5.) Amplifikation der RNAscope® Fluoreszenz Signale bei 40 °C mit *Amp 1-FL* 30 Minuten, *Amp 2-FL* 15 Minuten, *Amp 3-FL* 30 min, *Amp 4-FL* 15 Minuten (Variante A: RIM-BP1-C1 mit Alexa 488 Fluorophor, Otoferlin-C2 mit ATTO 550 Fluorophor), (6.) Zweimaliges Waschen mit Wasch-Puffer, (7.) Zweimaliges Waschen mit PBS. Im Anschluss wurde Immunhistochemie und Konfokalmikroskopie durchgeführt (2.5 Immunhistochemie und Fluoreszenzmikroskopie).

2.7 Audiometrie

Die Messung der Hirnstammaudiometrie (AEP, akustisch evozierte Potenziale) und Distorsionsprodukte otoakustischer Emissionen (DPOAE) wurde von Nadine Dietrich durchgeführt. Die Mäuse wurden mit einer Kombination aus Ketamin (125 mg/kg) und Xylazine (2,5 mg/kg) intraperitoneal anästhesiert.

Die Körpertemperatur wurde über eine rektale Temperatursonde überwacht und über eine Heizdecke (Hugo Sachs Elektronik–Harvard Apparatus) bei 37 °C konstant gehalten. Die anästhesierten Tiere wurden in einem mit schallabsorbierendem Material ausgekleideten Raum neben dem Lautsprecher positioniert. Sowohl für die Generation und Präsentation der akustischen Stimuli, als auch für die Datenmessung wurde ein TDT II System verwendet, welches über die BioSig Software (Tucker Davis Technologies) gesteuert wurde. Sinustöne (4 – 32 kHz, 10 ms Plateau, 1 ms \cos^2 rise/fall, 40 Hz) oder Klickreize (0,03 ms, 20 und 100 Hz) wurden ipsilateral über einen JBL 2402 Lautsprecher (JBL Professional Northridge, California, USA) präsentiert. Es wurden zwei AEP Mittelwertkurven für jede Tonintensität gebildet, indem die Potenziale (Messung bei 50 kHz für 20 ms, 1.300-mal) zwischen den subkutanen Nadelelektroden an Vertex und Mastoid 50.000-fach verstärkt und gefiltert (0,4 – 4 kHz) wurden. Die Hörschwelle wurde mit einer Messgenauigkeit von 10 dB bestimmt, indem visuell die niedrigste Stimulus Intensität bestimmt wurde, bei der in beiden AEP Mittelwertkurven reproduzierbare Potenziale hervorgerufen werden konnte, die sich von der Hintergrundaktivität abgrenzten. Diese wurde durch zwei unabhängige Beobachter festgelegt.

Für die Messung der DPOAEs wurden zwei Reintöne f_1 und f_2 im Frequenzverhältnis $f_2 = 1,2 \times f_1$ (Intensität $I_2 = I_1 - 10$ dB SPL, *sound pressure level*, Schalldruckpegel) über ein MF1 Lautsprechersystem (Tucker Davis Technologies) im geschlossenen Feld präsentiert. Die Emissionen wurden über eine maßgeschneiderte Sonde mit einem MKE-2 Mikrophon (Sennheiser, Hannover, Deutschland) im äußeren Gehörgang aufgenommen und verstärkt (Soundkarte DMX 6Fire, Terratec). Zur Analyse wurde die DPOAE Amplitude bei einer Frequenz $f_{dp} = 2 \times f_1 - f_2$ über einen individuell geschriebenen MATLAB Software Code (Mathworks) durch eine schnelle Fourier-Transformation in seine Frequenzanteile zerlegt und die Amplitude und das Rauschen bestimmt. Die Auswertung der Audiometrie Daten erfolgte mit der MATLAB Software (Mathworks). Die statistische Analyse der AEP und DPOAE Daten erfolgte mit einem one-way ANOVA Test und dem *post-hoc* Tukey's Test in Graphpad Prism.

2.8 Statistik

Signifikanzniveaus sind folgendermaßen gekennzeichnet: * wenn $p < 0,05$, ** wenn $p < 0,01$, *** wenn $p < 0,001$. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM (*standard error of the mean*, Standardfehler des Mittelwertes) angegeben, wenn nicht anders spezifiziert. Graphen wurden mit der Igor Pro Software (Wavemetrics, Lake Oswego, USA) und Abbildungen mit der Adobe Illustrator Software (Adobe Systems Inc., San Jose, USA) erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Eingeschränkte Hörfunktion durch RIM-BP1/2 Verlust

Um der Hypothese nachzugehen, dass bei RIM-BP2 Knockout-Mäusen eine zusätzliche genetische Deletion von RIM-BP1 die bei RIM-BP2 Knockout-Mäusen beobachtete auditorische Synaptopathie (Krunner et al. 2017) weiter verstärken würde, wurden verschiedene Hörtests (2.7 Audiometrie) mit RIM-BP1/2-Doppelknockout Mäusen durchgeführt. Diese zeigten tatsächlich, dass das Hörvermögen von RIM-BP1/2-Doppelknockout Mäusen im Vergleich zu RIM-BP2-Knockout-Mäusen stärker beeinträchtigt ist (Abbildung 4).

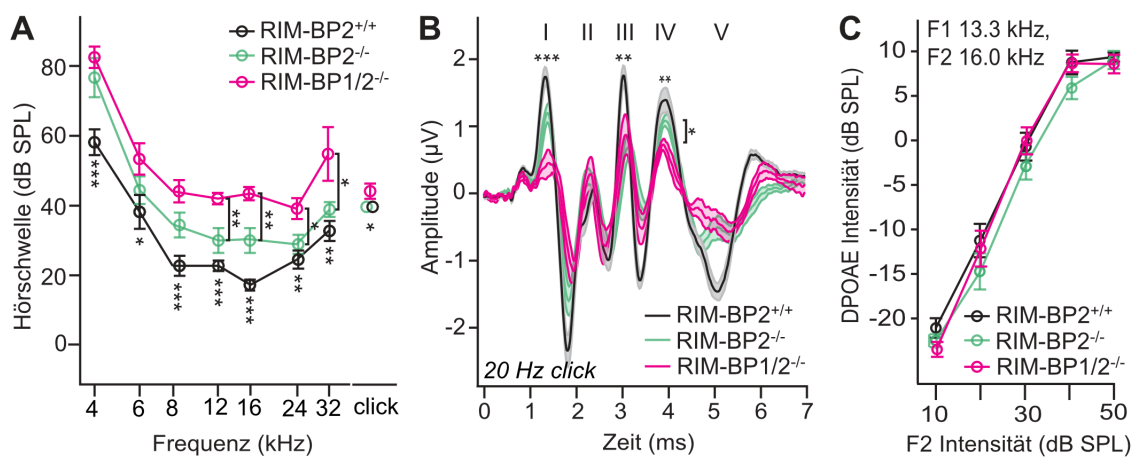


Abbildung 4: Eingeschränkte Hörfunktion durch RIM-BP1/2 Verlust

[A] Hörschwellen, **[B]** AEP und **[C]** DPOAE Antworten (f_1 : 13,3 kHz, f_2 : 16 kHz) der RIM-BP1/2-Doppelknockout Mäuse (magenta, *RIM-BP1/2^{-/-}*) im Vergleich zu RIM-BP2-Knockout Mäusen (grün, *RIM-BP2^{-/-}*) und deren Wurfgeschwistern (schwarz, *RIM-BP2^{+/+}*). **[A]** Die Hörschwellen der RIM-BP1/2-Doppelknockout Mäuse waren im Vergleich zu *RIM-BP2^{+/+}* Mäusen über alle gemessenen Frequenzen signifikant erhöht ($p_{4\text{kHz}} = 0,0007$, $p_{6\text{kHz}} = 0,01$, $p_{8\text{kHz}} = 0,0001$, $p_{12\text{kHz}} < 0,0001$, $p_{16\text{kHz}} < 0,0001$, $p_{24\text{kHz}} = 0,002$, $p_{32\text{kHz}} = 0,003$). Auch im Vergleich zu RIM-BP2-Knockout Mäusen unterscheiden sich die Hörschwellen in Bereichen $\geq 12\text{kHz}$ signifikant (angezeigt durch eckige Klammer: $p_{12\text{kHz}} = 0,003$, $p_{16\text{kHz}} = 0,004$, $p_{24\text{kHz}} = 0,03$, $p_{32\text{kHz}} = 0,02$). Die Hörschwelle für 80-dB Klickreize (click) war in RIM-BP1/2-Doppelknockout Mäusen im Vergleich zu RIM-BP2-Knockout Mäusen (*RIM-BP2^{-/-}*) und deren Wurfgeschwistern (*RIM-BP2^{-/-}*) signifikant erhöht ($p = 0,01$ and $p = 0,03$, entsprechend). **[B]** Die AEP zeigen eine charakteristische Wellenform (I – V) und bilden die akustisch evozierten Summen-Aktionspotenziale unterschiedlicher Neuronen Populationen der Hörbahn ab. Bei akustischer Stimulation von 80 dB mit 20 Hz zeigte sich eine deutliche Reduktion der AEP Amplituden von RIM-BP1/2-Doppelknockout Mäusen (magenta) im Vergleich zu *RIM-BP2^{+/+}* Mäusen (schwarz) (Welle I: $p = 0,0006$, Welle III: $p < 0,0001$, Welle IV: $p = 0,005$). Zusätzlich unterscheidet sich die Amplitude der Welle IV zwischen RIM-BP1/2-Doppelknockout Mäusen (magenta) und RIM-BP2-Knockout Mäusen (grün) signifikant (angezeigt durch eckige Klammer: $p = 0,03$). **[C]** Bei der Frequenz mit dem stärksten Hörschwellenanstieg der RIM-BP1/2-Doppelknockout Mäuse (siehe A, 16 kHz) wurde Überprüfung der cochleären Schallverstärkung DPOAE Antworten (f_1 : 13,3 kHz, f_2 : 16 kHz) gemessen. Die Amplituden unterschieden sich nicht zwischen den untersuchten Genotypen. **[A – C]** Alle Daten sind als Mittelwerte abgebildet (Mittelwert \pm SEM); Statistik: one-way ANOVA mit konsekutivem *post-hoc* Tukey's Test, Zusammenfassung der p -Werte in Tabelle 3; Signifikanzniveaus: keine Kennzeichnung bei $p \geq 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; n = Anzahl der Mäuse; Alter der Mäuse: 8 – 10 Wochen. RIM-BP1/2-Doppelknockout Mäuse (magenta, *RIM-BP1/2^{-/-}*, $n = 7$) wurden mit den Daten der RIM-BP2-Knockout-Mäuse (*RIM-BP2^{-/-}*, $n = 8$) und deren Wildtyp-Wurfgeschwistern (*RIM-BP2^{+/+}*, $n = 11$) verglichen, die in Krinner et al. 2017 publiziert wurden.

Die eingeschränkte Hörfunktion der RIM-BP1/2-Doppelknockout Mäuse (*RIM-BP1/2^{-/-}*) zeigte sich durch eine signifikante Erhöhung der Hörschwellen um durchschnittlich 20 dB SPL (SD \pm 4.0 dB SPL) (Abbildung 4A) im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (*RIM-BP2^{+/+}*) bei allen gemessenen Frequenzen und der 80 dB Klickreiz-Messung ($p_{4\text{kHz}} = 0,0007$, $p_{6\text{kHz}} = 0,01$, $p_{8\text{kHz}} = 0,0001$, $p_{12\text{kHz}} < 0,0001$, $p_{16\text{kHz}} < 0,0001$, $p_{24\text{kHz}} = 0,002$, $p_{32\text{kHz}} = 0,003$, $p_{\text{click}} = 0,01$; one-way ANOVA mit konsekutivem *post-hoc* Tukey's Test). Auch waren die Hörschwellen der RIM-BP1/2-Doppelknockout Mäuse im Bereich hoher Frequenzen (≥ 12 kHz) und der 80 dB Klickreiz-Messung signifikant höher als die Hörschwellen der RIM-BP2-Knockout Mäuse (*RIM-BP2^{-/-}*) (Abbildung 4A angezeigt durch eckige Klammer: $p_{12\text{kHz}} = 0,003$, $p_{16\text{kHz}} = 0,004$, $p_{24\text{kHz}} = 0,03$, $p_{32\text{kHz}} = 0,02$, $p_{\text{click}} = 0,03$; one-way ANOVA mit konsekutivem *post-hoc* Tukey's Test), was insgesamt bedeutet, dass zusätzlich zu RIM-BP2, auch RIM-BP1 im auditorischen System eine funktionelle Rolle spielt.

Um die Ursache für den Anstieg der Hörschwellen durch den zusätzlichen Verlust von RIM-BP1 weiter eingrenzen zu können, wurde zunächst getestet, ob ihr ein Defekt in der mechanoelektrischen Transduktion und cochleären Schallverstärkung durch die äußeren Haarzellen zugrunde liegt. Dies wurde durch die Messung der DPOAE, im Bereich des stärksten Hörschwellenanstiegs (16 kHz), überprüft (Abbildung 4C). Jedoch waren die DPOAE Amplituden (f_1 : 13,3 kHz, f_2 : 16 kHz) der RIM-BP1/2-Doppelknockout Mäuse sowohl im Vergleich zu *RIM-BP2^{+/+}* Wildtyp-Mäusen, als auch RIM-BP2-Knockout Mäusen unverändert, was einen Defekt in der cochleären Schallverstärkung und Funktion der äußeren Haarzellen durch die Deletion von RIM-BP1 und -2 ausschließt.

Im nächsten Schritt wurde mittels Hirnstammaudiometrie überprüft, ob in RIM-BP1/2-Doppelknockout Mäuse eine cochleäre oder retrocochleäre Schallempfindungsstörung vorliegt. Die bei der Hirnstammaudiometrie gemessenen AEP Wellen (Abbildung 4B) bilden die akustisch evozierten Summen-AP unterschiedlicher Neuronen-Populationen der Hörbahn ab. Während die AEP Welle I die peripheren Summen-AP der SGN (*N. cochlearis*) repräsentiert, repräsentieren Welle II – IV verschiedenen Zellgruppen aus dem Cochlearis-, sowie Olivenkern im auditorischen Hirnstamm und Welle V Neurone aus dem Colliculus inferior im auditorischen Mittelhirn (Melcher et al. 1996). Bei der akustischen Stimulation mit 80 dB und einer Stimulationsrate von 20 Hz zeigte sich eine deutliche Reduktion der AEP Amplituden bei den RIM-BP1/2-Doppelknockout Mäusen im Vergleich zu *RIM-BP2^{+/+}* Wildtyp-Mäusen (Welle I: $p = 0,0006$, Welle III: $p < 0,0001$, Welle IV: $p = 0,005$; one-way ANOVA mit konsekutivem *post-hoc* Tukey's Test, Tabelle 3). Bei einer Stimulationsrate von 20 Hz war bei RIM-BP1/2-Doppelknockout Mäusen im Vergleich zu RIM-BP2-Knockout Mäusen nur in der Amplitude der Welle IV ein signifikanter Unterschied zu sehen (Welle IV: $p = 0,03$; one-way ANOVA mit konsekutivem *post-hoc* Tukey's Test, Tabelle 3). Die Reduktion der Welle IV Amplitude durch den zusätzlichen RIM-BP1 Verlust in RIM-BP1/2-Doppelknockout Mäusen könnte auf einer Funktionsstörung im auditorischen Hirnstamm beruhen und ein möglicher Hinweis auf eine Funktion von RIM-BP1 im auditorischen Hirnstamm sein.

Im Vergleich mit RIM-BP2-Knockout Mäusen war bei einer Stimulationsrate von 20 Hz jedoch kein signifikanter Unterschied in den Amplituden der Wellen I und III in RIM-BP1/2-Doppelknockout Mäusen zu sehen (Tabelle 3). Erst bei höheren Stimulationsraten von 100 Hz zeigte sich zwischen RIM-BP1/2-Doppelknockout und RIM-BP2-Knockout Mäusen eine signifikante Reduktion der AEP Welle I Amplitude ($p = 0,03$, one-way ANOVA mit konsekutivem *post-hoc* Tukey's Test, Tabelle 3). Da sie Amplitude der AEP Welle I auf der synchronen Aktivität der SGN AP basiert, welche durch die Exozytose an der IHZ Bändersynapse ausgelöst werden, wurde im nächsten Schritt dieser Arbeit Untersuchungen der RIM-BP1/2-Doppelknockout IHZ durchgeführt, um herauszufinden, ob und welche Rolle RIM-BP1 an der IHZ-SGN Synapse spielt.

Tabelle 3: Zusammenfassung der p -Werte aus der statistischen AEP Daten Analyse

		Welle I	Welle II	Welle III	Welle IV	Welle V
20 Hz	<i>RIM-BP1/2^{-/-}</i> vs. <i>RIM-BP2^{+/+}</i>	0,0006 ***	0,9	0,001 **	0,005 **	0,5
	<i>RIM-BP1/2^{-/-}</i> vs. <i>RIM-BP2^{-/-}</i>	0,2	0,9	0,6	0,03 *	0,8
100 Hz	<i>RIM-BP1/2^{-/-}</i> vs. <i>RIM-BP2^{+/+}</i>	0,0004 ***	0,8	0,002 **	0,002 **	0,5
	<i>RIM-BP1/2^{-/-}</i> vs. <i>RIM-BP2^{-/-}</i>	0,03 *	0,8	0,008 **	0,05	0,7

Zusammenfassung der p -Werte aus der statistischen Analyse der AEP Wellen-Amplituden (Abbildung 4B): Vergleich der AEP Wellen I – V Amplituden zwischen *RIM-BP1/2^{-/-}* ($n = 7$), *RIM-BP2^{+/+}* ($n = 11$) and *RIM-BP2^{-/-}* ($n = 8$) Mäusen während 20 Hz und 100 Hz Klick-Stimulation. Statistik: one-way ANOVA mit konsekutivem *post-hoc* Tukey's Test, Signifikanzniveaus: keine Kennzeichnung bei $p \geq 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Daten der RIM-BP2-Knockout-Mäuse (*RIM-BP2^{-/-}*) und deren Wurfgeschwistern (*RIM-BP2^{+/+}*) wurden in Krinner et al. 2017 publiziert.

3.2 Untersuchung der Expression von RIM-BP1 in Maus IHZ

Experimentell ist die IHZ-Bändersynapse aufgrund ihrer Größe für morphologische Untersuchungen durch Immunhistochemie und Lichtmikroskopie gut zugänglich. In vorangegangenen Studien wurde bereits die Expression von RIM-BP2 in IHZ bestätigt (Krinner et al. 2017; Ortner et al. 2020). Durch spezifische RIM-BP2 Antikörper und STED-Mikroskopie wurde demonstriert, dass RIM-BP2 als Cluster in Steifen an der Bänder-Basis lokalisiert sind (Krinner et al. 2017). Zusätzlich fand sich RIM-BP2 in den durch Synapsin1/2 Antikörper markierten präsynaptischen Endigungen efferenter Neurone der lateralen Olive (Krinner et al. 2017; Ortner et al. 2020). In dieser Arbeit wurde Immunhistochemie mit einem RIM-BP1 Antikörper an *C57Bl/6* Wildtyp IHZ im Alter p14 – 16 durchgeführt, um die Expression von RIM-BP1 in den IHZ der Maus zu überprüfen (Abbildung 5).

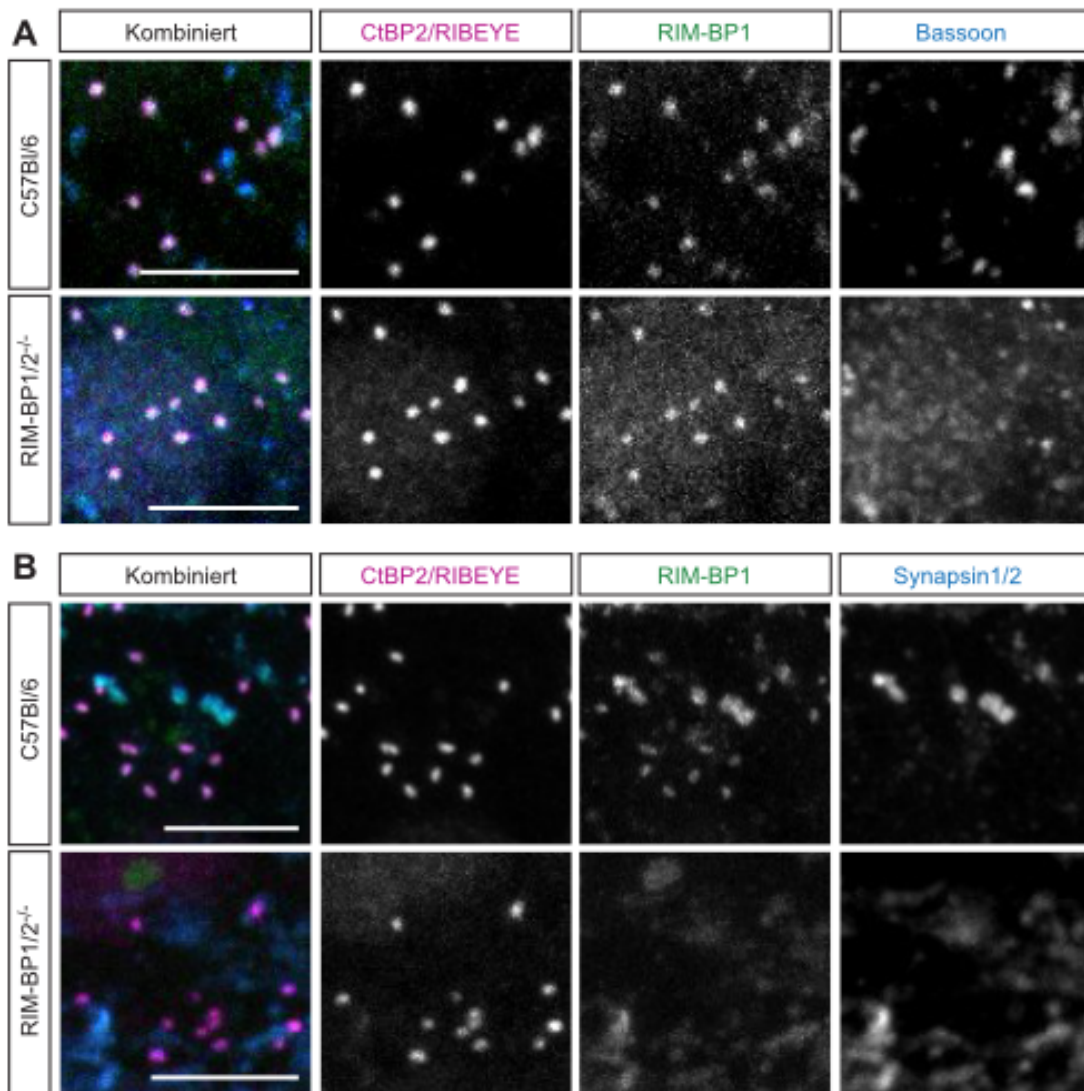


Abbildung 5: Expressions-Analyse von RIM-BP1 in Maus IHZ mittels Immunhistochemie

Projektion der maximalen Intensität von konfokal-mikroskopischen Aufnahmen nach Immunhistochemie an apikalen Cochlea-Windung von *C57BL/6* und *RIM-BP1/2^{-/-}* Mäusen (Alter p14 – 16). Die Immunfluoreszenz Signale der Antikörper gegen RIM-BP1 (grün) kolokalisieren mit CtBP2/RIBEYE (magenta) und Bassoon (blau, **[A]**) oder Synapsin1/2 (blau, **[B]**). CtBP2/RIBEYE markiert synaptische Bänder, Bassoon markiert die präsynaptische AZ, und Synapsin 1/2 markiert die präsynaptischen Endigungen der efferenten Neurone der lateralen Olive. Das RIM-BP1 Antikörper Signal ist jedoch auch in parallel-bearbeiteten *RIM-BP1/2^{-/-}* Doppelknockout IHZ (in **[A]**) zu sehen, was die Spezifität des Antikörpers in Maus IHZ in Frage stellt. Maßstabsbalken: 5 μ m.

Um die Lokalisation eines RIM-BP1 Antikörper Signals in der IHZ einer subzellulären Lokalisation zuordnen zu können, wurden bei der Immunhistochemie zusätzlich Antikörper gegen CtBP2/RIBEYE (Abbildung 5), zur Markierung des synaptischen Bandes, und Bassoon (Abbildung 5A), zur Markierung der präsynaptische AZ, oder Synapsin 1/2 (Abbildung 5B), zur Markierung der präsynaptischen Endigungen der efferenten Neurone der lateralen Olive kombiniert. In *C57BL/6* Wildtyp IHZ kolokalisiert das RIM-BP1 Antikörper Signal mit CtBP2/RIBEYE und Synapsin 1/2, was auf ein ähnliches Expressionsmuster von RIM-BP1 und RIM-BP2 (Krinner et al. 2017; Ortner et al. 2020) in

IHZ Bändersynapsen und efferenten Neuronen der lateralen Olive hindeuten könnte. Um die Spezifität des RIM-BP1 Antikörpers zu testen, wurde der RIM-BP1 Antikörper auch an parallel-bearbeiteten *RIM-BP1/2*-Doppelknockout IHZ verwendet, bei denen aufgrund der Gendeletion keine Protein-Expression zu erwarten ist (Abbildung 5). Das RIM-BP1 Antikörper-Signal in *RIM-BP1/2*-Doppelknockout IHZ ist in der kombinierten Färbung mit Synapsin 1/2 (Abbildung 5B) zwar weitestgehend verschwunden, jedoch nicht in der kombinierten Färbung mit Bassoon (Abbildung 5A). Dieses Ergebnis lässt daher insgesamt keine sichere Aussage über die Expression von RIM-BP1 in Maus IHZ zu, da die Spezifität des RIM-BP1 Antikörpers hier nicht belegt werden konnte. Daher wurde eine zusätzliche Methode angewendet, um die Expression von RIM-BP1 in den IHZ der Maus auf transkriptioneller Ebene mittels RNAscope® (ACDbio) zu überprüfen (Abbildung 6). RNAscope® basiert auf dem Nachweis von mRNA, welche durch spezifische, komplementäre RNA-Sonden gebunden wird. Diese Sonden werden durch Amplifikationsschritte mit fluoreszierenden Molekülen verschiedener Wellenlängen gebunden, sodass sie im Konfokal-Mikroskop durch die Anregung mit verschiedenen Lasern sichtbar werden.

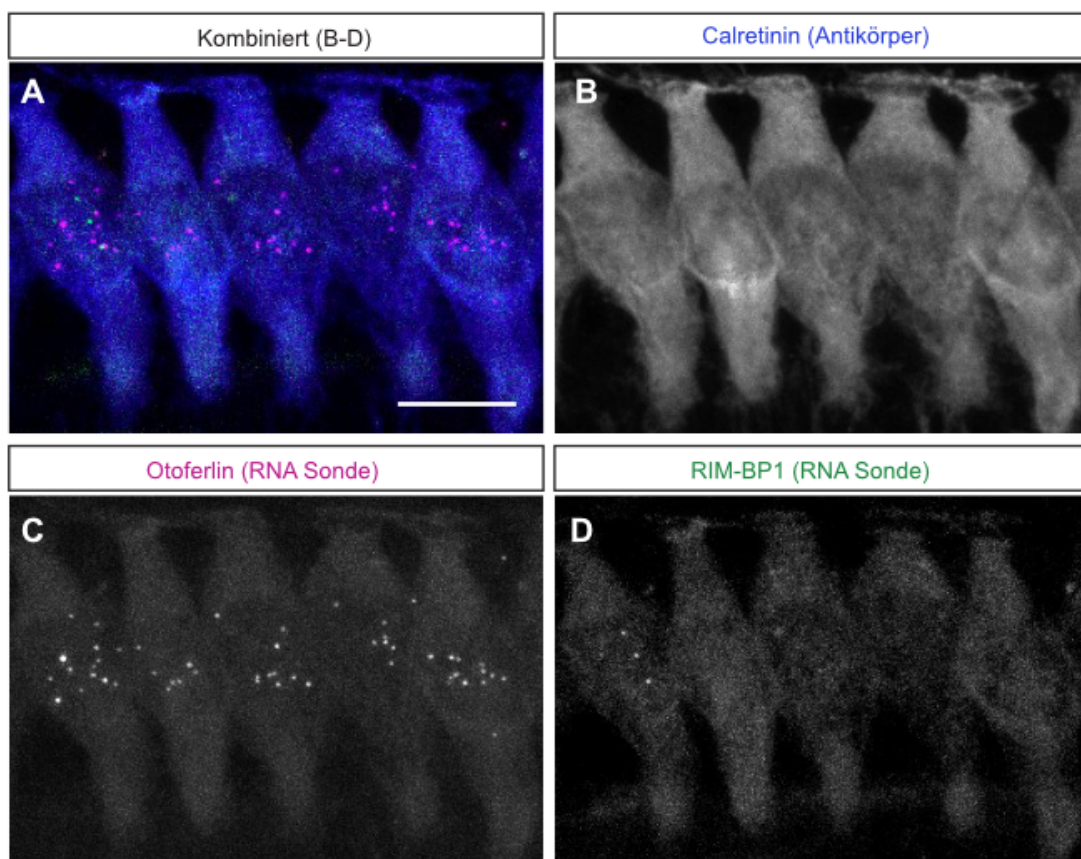


Abbildung 6: Expressions-Analyse von RIM-BP1 in Maus IHZ mittels RNAscope®

Projektion der maximalen Intensität von konfokal-mikroskopischen Aufnahmen nach RNAscope® und Immunhistochemie an apikalen Cochlea-Windung einer *C57BL/6* Maus (Alter p14). Das Immunfluoreszenz Signal des Antikörpers gegen Calretinin ([B], blau in kombiniertem Bild [A]) markiert die IHZ. Die Otoferlin RNAscope® Sonde ([C], magenta in kombiniertem Bild [A]) wurde als Positiv-Kontrolle benutzt. Otoferlin mRNA ist in IHZ besonders im Bereich der Zellkerne sichtbar. RIM-BP1 mRNA konnte nicht durch die RNAscope® Sonde nachgewiesen werden ([D], grün in kombiniertem Bild [A]). Maßstabsbalken: 10 µm

Die hier verwendete RIM-BP1-C1 RNA-Sonde (Abbildung 6D) wurde speziell für dieses Experiment von ACDBio angefertigt und bindet innerhalb der Region 5565-5927 von RIM-BP1 (NM_172449.2). Die RNA-Sonde für Otoferlin-C2 (Abbildung 6C) wurde als Positiv-Kontrolle verwendet, da die Expression von Otoferlin in der IHZ bekannt ist. Um die IHZ sichtbar zu machen, wurde am Anschluss an das RNAscope[®] Experiment Immunhistochemie mit einem Antikörper gegen Calretinin, einem endogener Ca^{2+} -Puffer der IHZ (Pangrsic et al. 2015), durchgeführt (Abbildung 6B). Das Signal der Otoferlin RNA-Sonde befindet sich in IHZ und ist besonders im Bereich der Zellkerne zu finden (Abbildung 6C), welche als dunklere Signal-Aussparung in der Calretinin-Antikörper-Färbung (Abbildung 6B) zu sehen sind. Die RIM-BP1 RNA-Sonde zeigte jedoch nur ein äußerst schwaches Signal, das nur in einer einzigen IHZ zu sehen ist (Abbildung 6D). Daher kann durch das RNAscope[®] Experiment keine sichere Aussage über die Expression von RIM-BP1 in 2-Wochen alten Maus IHZ gemacht werden.

3.3 Ca^{2+} -Einstrom der IHZ ist weitgehend unabhängig von RIM-BP1

Im nächsten Schritt dieser Arbeit wurden zellphysiologische Untersuchungen mittels der *patch-clamp* Methode (2.4 *Patch-clamp* Experimente) durchgeführt, um herauszufinden, ob und welche Rolle RIM-BP1 an der IHZ-SGN Synapse spielt. In dieser Arbeit wurde dabei die *whole-cell* Konfiguration benutzt, bei der gesamte Ca^{2+} -Ströme über die Plasmazellmembran und die Exozytose über alle Synapsen einer IHZ gemessen wird. Um einen intrazellulären elektrischen Zugang zu erhalten, wurde Amphotericin B verwendet, welches innerhalb der Kontaktfläche zwischen Patch-Pipette und Plasmazellmembran kleine Poren in der Plasmazellmembran der IHZ erzeugt, sodass ein geringer elektrischer Widerstand über die Membran entsteht, aber Diffusion zwischen der intrazellulären Flüssigkeit in der Patch-Pipette und dem Zytoplasma der IHZ bis auf monovalente Ionen unterbunden bleibt, um den physiologischen Zustand der IHZ weitgehend zu erhalten. IHZ wurden für je 10 ms in 5 mV Schritten von -100 bis +30 mV in der Spannungsklemme gehalten und die maximale Amplitude des spannungs-evozierten Ca^{2+} -Einstroms ermittelt (Abbildung 7A – B). Auf diese Weise konnte bereits in einer früheren Arbeit gezeigt werden, dass der Verlust von RIM-BP2 zu einer Reduktion des Ca^{2+} -Einstroms in IHZ führt (Krinner et al. 2017). Die hier gemessene maximale Amplitude des spannungsabhängigen Ca^{2+} -Einstroms in RIM-BP1/2-Doppelknockout IHZ (Rohdaten in Abbildung 7A) zeigte sich signifikant reduziert im Vergleich zu RIM-BP2-Wildtyp IHZ ($p = 0,02$; Wilcoxon Rangsummentest), war jedoch vergleichbar mit RIM-BP2-Knockout IHZ (Abbildung 7B, Tabelle 4). Auch beim Vergleich der integrierten *whole-cell* Ca^{2+} -Ströme (Q_{Ca}), die während unterschiedlich langen IHZ Depolarisationszeiten (5 – 200 ms) zu -14 mV gemessen wurden (Abbildung 8B, Tabelle 5), zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen RIM-BP1/2-Doppelknockout und RIM-BP2-Knockout IHZ.

Im Gegensatz zu RIM-BP2 (Krinner et al. 2017) sprechen diese Ergebnisse also insgesamt gegen eine Funktion von RIM-BP1 in der Regulation der Ca^{2+} -Kanal-Anzahl. Zusätzlich wurde die spannungsabhängige Aktivierung der Ca^{2+} -Kanäle aus diesen Daten berechnet (2.4 *Patch-clamp* Experimente), indem die letzten 8 ms der evozierten Ca^{2+} -Ströme benutzt wurden (Abbildung 7C). Von den normalisierten Aktivierungskurven der IHZ Ca^{2+} -Ströme und deren Analyse durch Anpassung einer Boltzmann-Funktion entspricht V_{half} der Spannung der halb-maximalen Aktivierung der *whole-cell* Ca^{2+} -Ströme und der Steigungsfaktor k spiegelt das Öffnungsverhalten (*gating*) der Ca^{2+} -Kanäle wider und repräsentiert damit die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung des Ca^{2+} -Kanäle (Abbildung 7C, Tabelle 4). Dabei konnte zwischen den hier untersuchten Genotypen (*RIM-BP2*^{+/+}, *RIM-BP2*^{-/-} und *RIM-BP1/2*^{-/-}) bezüglich der Spannungsabhängigkeit (V_{half} und k) der Ca^{2+} -Ströme kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden (Tabelle 4).

Zusammenfassend zeigte sich in dieser Arbeit, dass der zusätzliche Verlust von RIM-BP1 in *RIM-BP1/2*-Doppelknockout IHZ im Vergleich zu *RIM-BP2*-Knockout IHZ nicht zu einer stärkeren Reduktion des evozierten Ca^{2+} -Einstroms oder einer Änderung der spannungsabhängigen Aktivierung der Ca^{2+} -Kanäle in IHZ führt (Abbildung 7).

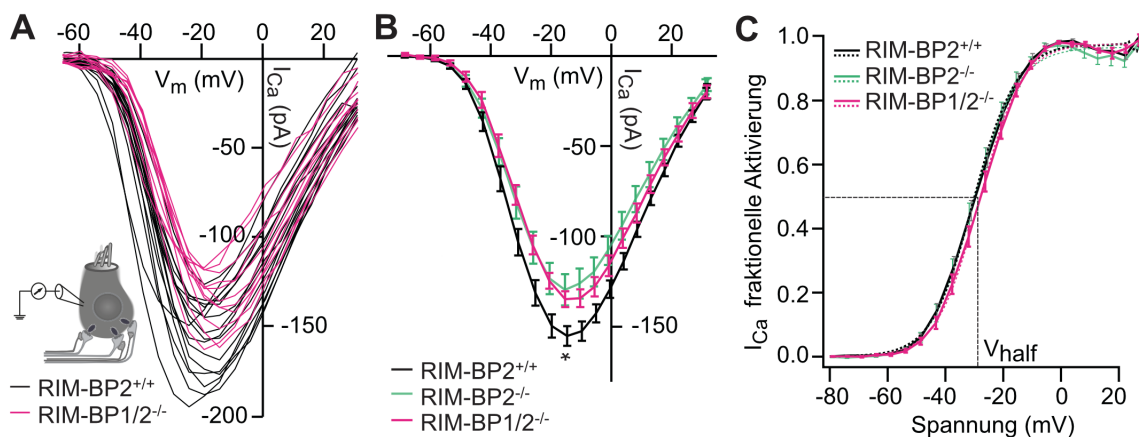


Abbildung 7: Ca^{2+} -Einstrom in IHZ ist weitgehend unabhängig von RIM-BP1

Whole-cell Kalziumströme (I_{Ca}) der IHZ in Abhängigkeit zum Membranpotenzial (V_m): Rohdaten **[A]** und Mittelwerte **[B]** der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Ströme aus *whole-cell patch-clamp* Experimenten (schematisch dargestellt in A) von *RIM-BP1/2*-Doppelknockout IHZ (magenta, $n = 15$) und *RIM-BP2*^{+/+} IHZ (schwarz, $n = 16$) und *RIM-BP2*^{-/-} IHZ (grün, $n = 17$, nur in B). **[C]** Die spannungsabhängigen Ca^{2+} -Strom-Aktivierungskurven wurden aus den Ca^{2+} -Strömen aus **[A – B]** berechnet. Abgebildet sind normalisierte Aktivierungskurven der IHZ Ca^{2+} -Ströme (durchgängige Linie) und deren Boltzmann-Fitfunktion (gestrichelte Linie). V_{half} kennzeichnet die Spannung der halb-maximalen Aktivierung der *whole-cell* Ca^{2+} -Ströme. **[A – C]** Die Datenpunkte **[B – C]** sind Mittelwerte (\pm SEM) aller IHZ; Statistik: Wilcoxon-Rangsummentest und Zweistichproben- t -Test; Mittelwerte (\pm SEM) und statistische p -Werte sind in Tabelle 4 angegeben. Signifikanzniveaus: keine Kennzeichnung bei $p \geq 0,05$, * $p < 0,05$. $n =$ Anzahl der IHZ; Alter der Mäuse: p14 – p16. Daten der *RIM-BP2*-Knockout-Mäuse (*RIM-BP2*^{-/-}) und deren Wurfgeschwistern (*RIM-BP2*^{+/+}) wurden in Krinner et al. 2017 publiziert.

Tabelle 4: Zusammenfassung der IHZ *whole-cell* Ca²⁺-Ströme und der statistischen Analyse

	Amplitude (pA)	V _{half} (mV)	Steigungsfaktor <i>k</i>
<i>RIM-BP2</i> ^{+/+} (n = 17)	-157 ± 6	-29,9 ± 0,9	6,9 ± 0,1
<i>RIM-BP2</i> ^{-/-} (n = 16)	-126 ± 9	-30,0 ± 1,5	6,7 ± 0,2
<i>RIM-BP1/2</i> ^{-/-} (n = 15)	-131 ± 1	-28,3 ± 0,1	6,9 ± 0,1
<i>p</i> -Wert (<i>RIM-BP1/2</i> ^{-/-} vs. <i>RIM-BP2</i> ^{+/+})	0,02 * Wilcoxon- Rangsummentest	0,3 Zweistichproben- <i>t</i> -Test	0,7 Wilcoxon- Rangsummentest
<i>p</i> -Wert (<i>RIM-BP1/2</i> ^{-/-} vs. <i>RIM-BP2</i> ^{-/-})	0,7 Zweistichproben- <i>t</i> -Test	0,2 Zweistichproben- <i>t</i> -Test	0,4 Zweistichproben- <i>t</i> -Test

Zusammenfassung der *whole-cell* Kalziumströme (I_{Ca}) von IHZ aus *RIM-BP1/2*-Doppelknockout Mäusen (*RIM-BP1/2*^{-/-}), *RIM-BP2*-Knockout Mäusen (*RIM-BP2*^{-/-}) und deren Wurfgeschwistern (*RIM-BP2*^{+/+}), dargestellt in Abbildung 7. Diese wurden bezüglich ihrer maximalen Amplitude (pA), V_{half} und des Steigungsfaktor *k* analysiert. Die Datenpunkte [B – C] sind Mittelwerte (± SEM) aller IHZ; Statistik: der verwendete Test ist in der Tabelle angegeben. Signifikanzniveaus: n.s. bei $p \geq 0,05$, * $p < 0,05$. n = Anzahl der IHZ; Alter der Mäuse: p14 – p16. Daten der *RIM-BP2*-Knockout-Mäuse (*RIM-BP2*^{-/-}) und deren Wurfgeschwistern (*RIM-BP2*^{+/+}) wurden in Krinner et al. 2017 publiziert.

3.4 RIM-BP1 reguliert die Exozytose des RRP

Um nun herauszufinden, ob *RIM-BP1* direkt an der Exozytose in IHZ beteiligt ist, wurden erneut *patch-clamp* Messungen in der *whole-cell* Konfiguration durchgeführt, denn die durch Ca²⁺-Einstrom ausgelöste Exozytose der IHZ kann durch die Messung der Membrankapazität (C_m) bestimmt werden (Abbildung 8A). Grundlage dafür ist, dass die Fusion von SV mit der IHZ Plasmamembran zu einer Vergrößerung der Membranoberfläche führt, welche direkt proportional zur C_m ist. Eine Zunahme der Membrankapazität (ΔC_m) spiegelt daher die Exozytose der IHZ wider. Im Experiment wurden IHZ für unterschiedlich lange Zeit (5 – 200 ms) zu -14 mV depolarisiert. ΔC_m wurde berechnet, indem die Datenpunkte über 400 ms vor und nach der Depolarisation gemittelt und daraus die Differenz gebildet wurde. Rohdaten einer repräsentative C_m Messung aus einem *whole-cell patch-clamp* Experiment und der dazu korrespondierenden Ca²⁺-Ströme von einer *RIM-BP1/2*-Doppelknockout IHZ sind in Abbildung 8A dargestellt: Verschiedene Grautöne markieren unterschiedliche Depolarisationszeiten zwischen 5 – 50 ms und die gestrichelten Linien zeigen dabei die mittlere C_m der IHZ vor und nach der Depolarisation, die für die Berechnung der ΔC_m (Abbildung 8B, oben) verwendet wurden. Sowohl die ΔC_m als auch die dazu korrespondierende, integrierten *whole-cell* Ca²⁺-Ströme (Q_{Ca}) wurden zwischen den einzelnen *RIM-BP* Genotypen verglichen (Abbildung 8B – C, Tabelle 5).

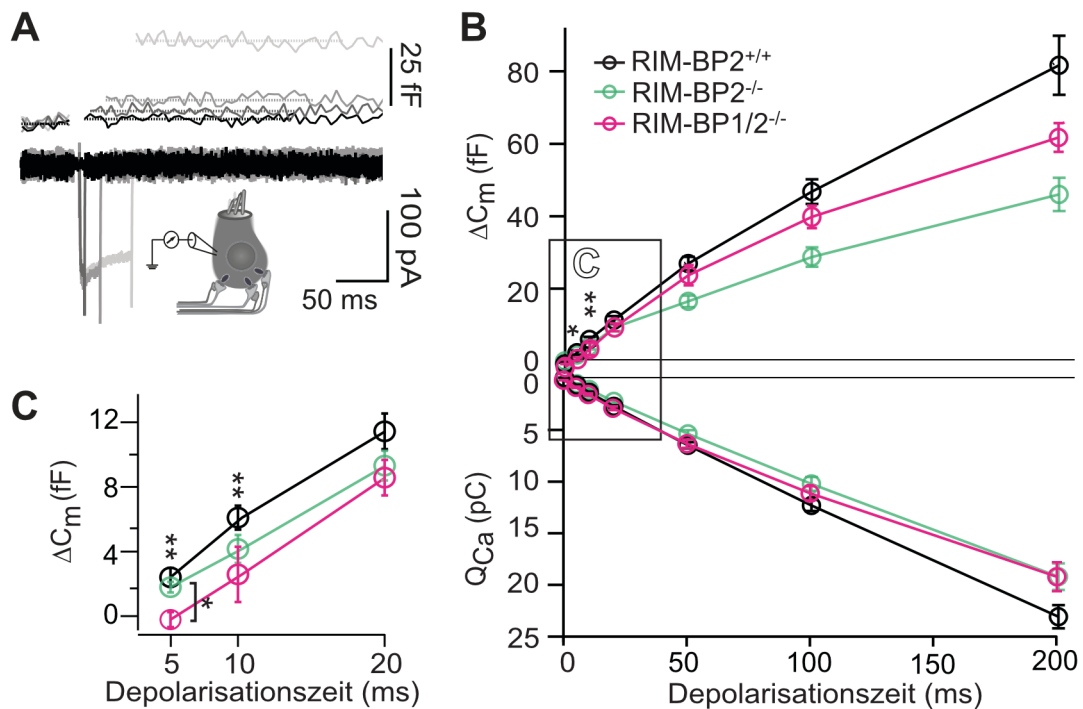


Abbildung 8: RIM-BP1 reguliert die Exozytose des RRP

[A] Rohdaten von repräsentativen Membran-Kapazitätsmessungen (oben, C_m) aus einem *whole-cell patch-clamp* Experiment (schematisch dargestellt) und der dazu korrespondierenden Ca^{2+} -Ströme (unten, I_{Ca}) von einer RIM-BP1/2-Doppelknockout IHZ, die für unterschiedlich lange Zeit (5, 10, 20, 50 ms; durch verschiedene Grautöne dargestellt) zu -14 mV depolarisiert wurde. Gestrichelte Linien zeigen die mittlere C_m der IHZ vor und nach der Depolarisation, die für die Berechnung der ΔC_m [in B] verwendet wurden. Maßstabsbalken: 50 ms, 25 fF (C_m), 100 pA (I_{Ca}). **[B – C]** Zusammenfassung der durch Exozytose hervorgerufene Änderungen der Membrankapazität (ΔC_m , obere y-Achse) und dazu korrespondierende, integrierte *whole-cell* Ca^{2+} -Ströme (Q_{Ca} , untere y-Achse) von IHZ aus RIM-BP1/2-Doppelknockout Mäusen (magenta, $RIM-BP1/2^{-/-}$; $n = 8$), RIM-BP2-Knockout Mäusen (grün, $RIM-BP2^{-/-}$; $n = 10$) und deren Wurfgeschwistern (schwarz, $RIM-BP2^{+/+}$; $n = 12$). Wie in [A] beschrieben, wurden IHZ für unterschiedlich lange Zeit (5–200 ms) zu -14 mV depolarisiert. In [C] sind die Datenpunkte zwischen 5 – 20 ms zur besseren Sichtbarkeit vergrößert dargestellt. In RIM-BP1/2-Doppelknockout IHZ zeigte sich eine signifikante Reduktion der Exozytose bei 5 ms ($p = 0,003$) und 10 ms ($p = 0,04$) im Vergleich zu $RIM-BP2^{+/+}$ IHZ. Bei 5 ms war die Exozytose zudem im Vergleich zu RIM-BP2-Knockout IHZ signifikant reduziert (angezeigt durch eckige Klammer: $p = 0,03$). Die abgebildeten Datenpunkte sind Mittelwerte (\pm SEM) aller gemessenen IHZ; Statistik: one-way ANOVA mit konsekutivem *post-hoc* Tukey's Test, Zusammenfassung der p -Werte in Tabelle 5. Signifikanzniveaus: keine Kennzeichnung bei $p \geq 0,05$, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$. $n =$ Anzahl der IHZ; Alter der Mäuse: p14 – p16. Daten der RIM-BP2-Knockout-Mäuse ($RIM-BP2^{-/-}$) und deren Wurfgeschwistern ($RIM-BP2^{+/+}$) wurden in Krinner et al. 2017 publiziert.

Beim Vergleich der ΔC_m zwischen den RIM-BP Genotypen zeigte sich bei einer Depolarisationszeit von 5 ms und 10 ms eine signifikante Reduktion der Exozytose in RIM-BP1/2-Doppelknockout IHZ im Vergleich zu RIM-BP2-Wildtyp IHZ ($p_{5ms} = 0,003$; $p_{10ms} = 0,04$; one-way ANOVA mit konsekutivem *post-hoc* Tukey's Test, Abbildung 8C, Tabelle 5). Bei einer Depolarisationszeit von 5 ms war die Reduktion der Exozytose in RIM-BP1/2-Doppelknockout IHZ im Vergleich zu RIM-BP2-Wildtyp IHZ noch stärker ausgeprägt und auch signifikant kleiner als in RIM-BP2-Knockout IHZ ($p_{5ms} = 0,03$; one-way ANOVA mit konsekutivem *post-hoc* Tukey's Test, Abbildung 8C, Tabelle 5). Dies lässt Rückschlüsse auf eine Funktion von RIM-BP1 bei der Exozytose des RRP zu, da kurze Depolarisationszeiten bis 20 ms (Abbildung 8C) primär zur Exozytose des RRP führen (Moser und Beutner 2000).

Das Wiederauffüllen von SV nach der Exozytose des RRP, welches bei längeren Depolarisationszeiten ab 20 ms eine Rolle spielt und in RIM-BP2-Knockout IHZ beeinträchtigt ist (Krinner et al. 2017), war in RIM-BP1/2-Doppelknockout IHZ nicht signifikant verändert (Abbildung 8B, Tabelle 5).

Tabelle 5: Zusammenfassung der p -Werte aus der statistischen *patch-clamp* Daten Analyse

		5 ms	10 ms	20 ms	50 ms	100 ms	200 ms
ΔC_m	<i>RIM-BP1/2^{-/-}</i> vs. <i>RIM-BP2^{+/+}</i>	0,003 **	0,04 *	0,07	0,3	0,3	0,2
	<i>RIM-BP1/2^{-/-}</i> vs. <i>RIM-BP2^{-/-}</i>	0,03 *	0,5	0,8	0,2	0,2	0,3
Q_{real}	<i>RIM-BP1/2^{-/-}</i> vs. <i>RIM-BP2^{+/+}</i>	0,6	0,9	0,6	0,3	0,3	0,07
	<i>RIM-BP1/2^{-/-}</i> vs. <i>RIM-BP2^{-/-}</i>	0,3	0,1	0,1	0,6	0,6	0,9

Zusammenfassung der p -Werte aus der statistischen Analyse der *whole-cell patch-clamp* Membran-Kapazitätsmessungen (ΔC_m) und der dazu korrespondierenden, integrierten *whole-cell* Ca^{2+} -Ströme (Q_{Ca}) (Abbildung 8B – C): Vergleich der ΔC_m und Q_{Ca} zwischen *RIM-BP1/2^{-/-}* ($n = 8$), *RIM-BP2^{+/+}* ($n = 12$) and *RIM-BP2^{-/-}* ($n = 10$) IHZ während unterschiedlich langer Depolarisationsdauer (5 – 200 ms) zu -14 mV. Statistik: one-way ANOVA mit konsekutivem *post-hoc* Tukey's Test, Signifikanzniveaus: keine Kennzeichnung bei $p \geq 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Daten der RIM-BP2-Knockout-Mäuse (*RIM-BP2^{-/-}*) und deren Wurfgeschwistern (*RIM-BP2^{+/+}*) wurden in Krinner et al. 2017 publiziert.

4 Diskussion

Unter Verwendung der RIM-BP1/2 Doppelknockout-Mauslinie konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass im Vergleich zu Wildtyp Mäusen neben einer Anhebung der Hörschwelle um durchschnittlich 20 dB SPL bei erhaltener cochleärer Verstärkerfunktion durch die äußeren Haarzellen eine statistisch signifikante Reduktion der AEP Wellenamplitude I, III und IV besteht. Zudem war eine statistisch signifikante Reduktion der AEP Wellenamplitude IV (20 Hz) und der AEP Wellenamplitude I (100 Hz) der RIM-BP1/2-Doppelknockout-Mäuse im Vergleich zu den RIM-BP2-Knockout-Mäusen zu sehen. Dies zeigt, dass nicht nur RIM-BP2, sondern auch RIM-BP1 für das periphere Hören von Mäusen eine wichtige Rolle spielt und der Verlust von RIM-BP1 und -2 zusammen eine stärkere auditorische Synaptopathie hervorruft als die Deletion von RIM-BP2 alleine.

Ursächlich für die auditorische Synaptopathie können durch das Fehlen von RIM-BP1 bedingte, funktionelle Veränderungen an der IHZ Bändersynapse sein, wie zum Beispiel ein Defizit im spannungsabhängigen Ca^{2+} -Einstrom oder der Exozytose. Beide Parameter wurden durch elektrophysiologische *patch-clamp* Messungen an IHZ erfasst: Die Exozytose zeigte sich in RIM-BP1/2-Doppelknockout IHZ speziell bei kurzen Depolarisationszeiten (< 20 ms) signifikant reduziert. Der Effekt war am stärksten bei 5 ms ausgeprägt, wo sich auch eine signifikante Reduktion der Exozytose gegenüber RIM-BP2-Knockout IHZ zeigte. Bezüglich des Ca^{2+} -Stroms wirkte sich die zusätzliche RIM-BP1 Deletion in RIM-BP1/2 Doppelknockout-IHZ im Vergleich zu RIM-BP2 Knockout-IHZ nicht weiter auf die Amplitude oder die Spannungsabhängigkeit der *whole-cell* Ca^{2+} -Ströme aus. Dies spricht primär gegen eine Rolle von RIM-BP1 in Bezug auf die Regulierung des spannungsabhängigen Ca^{2+} -Einstroms in IHZ Bändersynapsen. Dem gegenüber zeigten Daten aus der Retina Bändersynapse, dass dort sowohl RIM-BP2, als auch RIM-BP1 eine gleichermaßen große Rolle bei der Regulation der synaptischen Dichte und Gruppierung der Ca^{2+} -Kanäle spielen: Die Anzahl der präsynaptischen Ca^{2+} -Kanäle war durch den RIM-BP1 oder -2 Verlust signifikant reduziert (Luo et al. 2017). Einen ähnlichen Effekt hatte die Deletion von RIM-BP2 auf die IHZ Bändersynapse, wo in RIM-BP2-Knockout IHZ sowohl die Zahl der synaptischen Ca^{2+} -Kanäle als auch der synaptische Ca^{2+} -Einstrom signifikant reduziert waren (Krinner et al. 2017). (1) Ein möglicher Grund für die abweichenden Ergebnisse in Bezug auf die Beteiligung von RIM-BP1 in der Regulation der Ca^{2+} -Kanäle zwischen der IHZ und Retina Bändersynapse könnte die Kompensation eines möglichen Ca^{2+} -Kanal Verlustes an der IHZ Bändersynapse durch anderer CAZ Proteine sein. Es wäre primär zu überprüfen, ob der Verlust von RIM-BP1/2 in IHZ Bändersynapsen – wie in der Retina Bändersynapse (Luo et al. 2017) – zu einer kompensatorischen Hochregulation der RIM Expression führt. Eine Synergie von RIMs und RIM-BPs wurde sowohl an konventionellen ZNS Synapsen (Acuna et al. 2016), als auch biochemisch (Wu et al. 2019) demonstriert. Das Zusammenspiel von RIM und RIM-BPs ist nicht nur für die morphologische und physiologische Integrität konventioneller ZNS Synapsen essentiell (Acuna et al. 2016), wo der gemeinsame Verlust

von RIM1/2 und RIM-BP1/2 zu einer drastischen Funktionseinschränkung mit extremen strukturellen und funktionellen Folgen für die Synapse führte (Acuna et al. 2016), sondern auch *in vitro*, wo durch Selbstorganisation und flüssig-flüssig Phasentrennung, AZ-ähnliche biochemische Kondensate entstehen, die spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle bündeln (Wu et al. 2019). Letztlich könnte kompensatorische und synergistische Effekte zwischen RIMs und RIM-BPs an der IHZ Bändersynapsen durch quantitative Expressionsanalysen von RIMs und RIM-BPs in den jeweilig inversen Mausmutanten oder durch die Analyse von RIM2/RIM-BP1/2 Mausmutanten überprüft werden. (2) Zum anderen wäre ein möglicher Grund für die abweichenden Ergebnisse in Bezug auf die Beteiligung von RIM-BP1 in der Regulation der Ca^{2+} -Kanäle zwischen der IHZ und Retina Bändersynapse, dass die zelluläre Gesamtzahl der Ca^{2+} -Kanäle durch den zusätzlichen RIM-BP1-Verlust unverändert blieb, diese jedoch weniger synaptisch, sondern teilweise extrasynaptisch lokalisiert sind, was durch die durchgeführte *whole-cell patch-clamp* Messungen nicht erfasst werden konnte. Eine Möglichkeit diese Hypothese zu überprüfen wäre es, den synaptischen Ca^{2+} -Einstrom mittels *whole-cell patch-clamp* Messungen kombiniert mit konfokalem Ca^{2+} -Imaging zu messen (Frank et al. 2009; Wong et al. 2013) oder Immunhistochemie der Ca^{2+} -Kanäle kombiniert mit STED-Mikroskopie durchzuführen (Neef et al. 2018). Beide Methoden zeigten in RIM-BP2-Knockout IHZ eine signifikante Reduktion der synaptischen Ca^{2+} -Kanaldichte (Krinner et al. 2017).

Wahrscheinlicher ist jedoch, dass die stärkere auditorische Synaptopathie in RIM-BP1/2-Doppelknockout Mäusen durch ein Defizit in der Exozytose selbst oder einem Defizit in der Ca^{2+} -Kanal – SV Kopplung hervorgerufen wurde. Denn ein Einfluss von RIM-BP1 auf die Exozytose zeigte sich in RIM-BP1/2-Doppelknockout IHZ speziell bei kurzen Depolarisationszeiten (< 20 ms). Sowohl gegenüber Wildtyp IHZ, als auch RIM-BP2 Knockout-IHZ war die Exozytose in RIM-BP1/2-Doppelknockout IHZ bei kurzen Depolarisationszeiten (5 ms) statistisch signifikant reduziert, was auf eine Funktion von RIM-BP1 in der Exozytose von SV aus dem RRP spricht: Die Menge und Synchronizität der Exozytose von SV aus dem RRP bestimmt maßgeblich die Größe der exzitatorischen postsynaptischen Potentiale (EPSP), welche die Generierung von postsynaptischen APs in den SGNs auslösen. Da die AEP I Wellenamplitude das Summen-AP der SGNs abbildet, ist daher die Größe, kurze Latenz und zeitliche Präzision der EPSPs entscheidend für die AEP I Wellenamplitude (Wittig und Parsons 2008; Buran et al. 2010; Rutherford et al. 2012; Li et al. 2014). Dazu passt, dass die AEP I Wellenamplitude von RIM-BP1/2-Doppelknockout Mausmutanten drastisch reduziert war. Besonders stark ausgeprägt war der Effekt der zusätzlichen RIM-BP1 Deletion bei höherer Stimulationsfrequenz (100 Hz), wo sich auch im Vergleich zu RIM-BP2 Mausmutanten eine statistisch signifikante Reduktion der AEP I Wellenamplitude zeigte. Der beobachtete Effekt wäre durchaus damit zu erklären, dass in RIM-BP1/2-Doppelknockout Mausmutanten unabhängig von der Menge der Exozytose von SV aus dem RRP ein Defizit in der Ca^{2+} -Kanal – SV Kopplung und damit der zeitlichen Präzision der Exozytose besteht. Solch ein Defizit in der Ca^{2+} -Kanal – SV Kopplung wurde

für RIM-BPs an diversen Synapsen beschrieben (Liu et al. 2011; Acuna et al. 2015; Müller et al. 2015; Grauel et al. 2016; Luo et al. 2017). In der Retina Bändersynapse zum Beispiel erhöhte die kombinierte RIM-BP1/2 Deletion bei der Exozytose die Sensitivität für den langsamen Ca^{2+} -Chelator EGTA, was dafür spricht, dass auch die enge Kopplung zwischen den übrigen Ca^{2+} -Kanälen und den SV durch den RIM-BP1/2 Verlust beeinträchtigt ist (Luo et al. 2017). Ob beide RIM-BPs zusammen, oder eines der RIM-BPs (1 oder 2) für die Ca^{2+} -Kanal – SV Kopplung in den Bändersynapsen der Retina verantwortlich ist, wurde nicht im Detail bestimmt (Luo et al. 2017). In der IHZ Bändersynapse wurde für RIM-BP2 kein Einfluss auf die Kopplung zwischen Ca^{2+} -Kanälen und den SV festgestellt (Krunner et al. 2017). Die Ca^{2+} -Kanal – Exozytose Kopplung wurde in RIM-BP2 Knockout-IHZ durch eine schrittweise Blockierung der Ca^{2+} -Kanäle mit Isradipin bestimmt (Krunner et al. 2017). Es bleibt daher offen, ob nicht gegebenenfalls RIM-BP1 an der Ca^{2+} -Kanal – SV Kopplung in IHZ beteiligt ist.

Weitere Hinweise auf die genaue funktionelle Rolle von RIM-BP1 können durch die Bestimmung der zellulären und subzellulären Lokalisation von RIM-BP1 durch fluoreszenzbasierte Expressionsanalyse gewonnen werden. Um die Expression und Lokalisation von RIM-BP1 in IHZ der Maus zu überprüfen und zu untersuchen, ob RIM-BP1 möglicherweise – ähnlich wie RIM-BP2 (Krunner et al. 2017) – an der Bändersynapse lokalisiert ist, wurde in dieser Arbeit durch zwei verschiedene fluoreszenzbasierte Methoden untersucht. i) Dabei waren die Ergebnisse der Expressionsanalyse von RIM-BP1 mittels Immunhistochemie aufgrund der ungeklärten Antikörperspezifität nicht eindeutig. ii) Auch durch die RNA Expressionsanalyse mittels RNAscope® Technik konnte RIM-BP1 nicht sicher in IHZ der Maus Cochlea nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit publizierten RT-PCR (Reverse-Transkriptase PCR) Experimenten, die keine RIM-BP1 mRNA in IHZ der Maus detektierten (Ortner et al. 2020; Krunner et al. 2021). In Krunner et al. 2021 konnte RIM-BP1 mRNA jedoch im Corti-Organ der Maus nachgewiesen werden, was eine Expression von RIM-BP1 in SGNs und/oder efferenten auditorische Fasern aus dem oberen, lateralen Olivenkern nicht ausschließt. Daher – und auf Grundlage der *in vivo* Daten dieser Arbeit – muss die Alternativhypothese, dass RIM-BP1 an der IHZ Bändersynapse nicht (nur) präsynaptisch, sondern (auch) postsynaptisch in SGNs und/oder efferenten auditorische Fasern eine funktionelle Rolle spielen könnte, diskutiert werden. (1) Eine Funktion von RIM-BP1 in den efferenten auditorische Fasern ist auf Grundlage der *in vivo* Daten durchaus denkbar, da die AEP IV Wellenamplitude von RIM-BP1/2-Doppelknockout Mausmutanten im Vergleich zu RIM-BP2-Knockout Mäusen signifikant reduziert war und die AEP Welle IV dem auditorischen Hirnstamm zuzuordnen ist, in dem sich auch der laterale obere Olivenkern befindet (Melcher et al. 1996). Die efferenten auditorische Fasern aus dem lateralem Olivenkern modulieren durch ihre Innervation der SGN Synapsenköpfchen an der IHZ die afferente synaptische Aktivität der SGNs. Welche synaptischen Mechanismen der Modulation zugrunde liegen, ist noch nicht bekannt (Übersichtsarbeit: Fuchs und Lauer 2018). Ob RIM-BP1, ähnlich wie RIM-BP2 an

der efferenten Synapse exprimiert ist (Krinner et al. 2017; Ortner et al. 2020), muss durch spezifische RIM-BP1 Antikörper untersucht werden. Des Weiteren könnte die Amplitudenverminderung der AEP Wellenamplitude I, die das Summen-AP der SGNs repräsentiert, zudem durch postsynaptische Effekte in den SGNs bedingt sein. Dabei wären Änderungen in der Anzahl, Dichte oder den physikalischen Eigenschaften der postsynaptischen Rezeptoren oder Ionenkanäle der SGNs möglich (Nirenberg und Yifrach 2020). Verschiedene experimentelle Ansätze, wie extrazelluläre Einzelfaserableitung am N. cochlearis, die simultane Messung von präsynaptischem Ca^{2+} -Einstrom und von durch Exozytose freigesetztem Glutamat mittels Fluoreszenz-Mikroskopie (Özçete und Moser 2020) oder „gepaarte“ *patch-clamp* Messungen der IHZ und Synapsenköpfchen der SGNs (Goutman und Glowatzki 2007), wären geeignete Techniken, um ein möglicherweise verändertes Spikeverhalten der SGNs in Bezug auf die präsynaptische Aktivität der IHZ zu analysieren und korrelieren. Auch Experimente an einer konditionellen RIM-BP1 Knockout-Mauslinie könnte nützlich sein, um die Funktion von RIM-BP1 in den einzelnen Stationen der Hörbahn isoliert untersuchen zu können. Insgesamt scheint RIM-BP1 im Vergleich zu RIM-BP2 jedoch trotz der verstärkten Schwerhörigkeit von RIM-BP1/2-Doppelknockout Mäusen im Vergleich zu RIM-BP2-Knockout Mäusen, an der IHZ Bändersynapse eine subtilere, wenn auch nicht weniger interessante Rolle zu spielen.

5 Zusammenfassung

Die Bändersynapsen von cochleären inneren Haarzellen sind hochspezialisiert, um äußerst präzise und mit höchster Geschwindigkeit eintreffende akustische Signale in einen neuronalen Kode zu transformieren, der von den Spiralganglion Neuronen (*N. cochlearis*) über den Hörnerv an das zentrale Nervensystem geleitet wird. Um den hohen Anforderungen zu entsprechen, folgen die Bändersynapsen einem spezialisierten Aufbau, der von konventionellen Synapsen des zentralen Nervensystems abweicht. Eine zentrale Rolle spielen die präsynaptisch lokalisierten *Rab3-interacting molecule* (RIM) *binding proteins* (RIM-BPs), welche über mehrere Domänen sowohl mit den Ca^{2+} -Kanälen, als auch RIMs und Bassoon interagieren, die strukturell und funktionell an der Exozytose von synaptischen Vesikeln beteiligt sind. Bisher wurde in inneren Haarzellen nur die Funktion von RIM-BP2 untersucht. Dabei wurde entdeckt, dass die genetische Deletion von RIM-BP2 in Mäusen zu einer auditorische Synaptopathie führt, die durch eine reduzierte Anzahl an synaptischen Ca^{2+} -Kanälen und einer gestörten Exozytose an Bändersynapsen der inneren Haarzellen hervorgerufen wurde. Ob auch andere RIM-BPs, wie zum Beispiel RIM-BP1 in IHZ eine Rolle spielen, und welche das sein könnte, ist bislang ungeklärt.

In dieser Arbeit wurden *in vivo* Hirnstammaudiometrie und *in vitro patch-clamp* Messungen an RIM-BP1/2-Doppelknockout Mäusen, sowie eine Expressionsanalyse von RIM-BP1 in inneren Haarzellen durchgeführt. Dabei zeigen die Ergebnisse der Hirnstammaudiometrie, dass zusätzlich zu RIM-BP2, auch RIM-BP1 für das periphere Hören der Mäuse wichtig ist und der Verlust von RIM-BP1 und 2 zusammen eine stärkere auditorische Synaptopathie hervorruft als die Deletion von RIM-BP2 alleine. Durch elektrophysiologische *patch-clamp* Messungen an inneren Haarzellen konnte keine zusätzliche Auswirkung der RIM-BP1 Deletion auf die Amplitude oder die Spannungsabhängigkeit der Ca^{2+} -Ströme in inneren Haarzellen von RIM-BP1/2-Doppelknockout Mäusen gefunden werden. Daher kann geschlussfolgert werden, dass zwar RIM-BP2, jedoch nicht RIM-BP1 an der Regulation der Ca^{2+} -Kanäle an den Bändersynapsen innerer Haarzellen beteiligt ist. Jedoch wurde eine Reduktion der Exozytose von RIM-BP1/2-Doppelknockout inneren Haarzellen bei kurzen Depolarisationszeiten (< 20 ms) gefunden, welche sich signifikant von RIM-BP2-Knockout inneren Haarzellen unterschied. Dies deutet auf eine Funktion von RIM-BP1 in der Exozytose von synaptischen Vesikeln aus dem „*readily releasable pool*“ hin. Insgesamt scheint RIM-BP2 im Vergleich zu RIM-BP1 trotz der verstärkten Schwerhörigkeit von RIM-BP1/2-Doppelknockout Mäusen im Vergleich zu RIM-BP2-Knockout Mäusen, an der inneren Haarzell-Bändersynapse funktionell eine größere Rolle zu spielen.

6 Publikation

Titel: RIM-binding proteins are required for normal sound-encoding at afferent inner hair cell synapses

Autoren: Stefanie Krinner (S.K.), Friederike Predoehl (F.P.), Dinah Burfeind (D.B.), Christian Vogl (C.V.) and Tobias Moser (T.M.)

Autorenbeiträge: S.K. and T.M. haben die Studie geplant. S.K. hat Immunhistochemie, RNAscope[®], Konfokalmikroskopie und *patch-clamp* Messungen durchgeführt. F.P. hat RT-PCR durchgeführt. D.B. and C.V. haben zu RNAscope[®] Experimenten beigetragen. T.M. and S.K. haben unter Beteiligung der Ko-Autoren das Manuskript erstellt. T.M ist korrespondierender Autor.

Zitation: Krinner S, Predoehl F, Burfeind D, Vogl C, Moser T (2021): RIM-Binding Proteins Are Required for Normal Sound-Encoding at Afferent Inner Hair Cell Synapses. *Front Mol Neurosci* 14, 651935

Zeitschrift: Frontiers in Molecular Neuroscience

Art der Publikation: Original Research Article

Eingereicht am: 11.01.2021

Akzeptiert am: 22.02.2021

Publiziert am: 23.03.2021

Schlüsselbegriffe: RIM-BP, Calcium, Exocytosis, Active Zone (AZ), Cochlea, Hearing, Ribbon Synapse



RIM-Binding Proteins Are Required for Normal Sound-Encoding at Afferent Inner Hair Cell Synapses

Stefanie Krinner^{1,2,3}, Friederike Predoehl¹, Dinah Burfeind⁴, Christian Vogl^{3,4†} and Tobias Moser^{1,2,3,5*†}

¹ Institute for Auditory Neuroscience and InnerEarLab, University Medical Center Göttingen, Göttingen, Germany,

² Collaborative Research Center 1286, University of Göttingen, Göttingen, Germany, ³ Auditory Neuroscience Group, Max Planck Institute of Experimental Medicine, Göttingen, Germany, ⁴ Presynaptogenesis and Intracellular Transport in Hair Cells Group, Institute for Auditory Neuroscience and InnerEarLab, University Medical Center Göttingen, Göttingen, Germany,

⁵ Multiscale Bioimaging Cluster of Excellence, University of Göttingen, Göttingen, Germany

OPEN ACCESS

Edited by:

Steven Haym Green,
The University of Iowa, United States

Reviewed by:

Henrique Prado von Gersdorff,
Oregon Health and Science
University, United States
Juan D. Goutman,
CONICET Instituto de Investigaciones
en Ingeniería Genética y Biología
Molecular Dr. Héctor N. Torres
(INGEBI), Argentina

*Correspondence:

Tobias Moser
tmoser@gwdg.de

†ORCID:

Tobias Moser
orcid.org/0000-0001-7145-0533
Christian Vogl
orcid.org/0000-0003-4432-2733

Received: 11 January 2021

Accepted: 22 February 2021

Published: 23 March 2021

Citation:

Krinner S, Predoehl F, Burfeind D,
Vogl C and Moser T (2021)
RIM-Binding Proteins Are Required
for Normal Sound-Encoding
at Afferent Inner Hair Cell Synapses.
Front. Mol. Neurosci. 14:651935.
doi: 10.3389/fnmol.2021.651935

The afferent synapses between inner hair cells (IHC) and spiral ganglion neurons are specialized to faithfully encode sound with sub-millisecond precision over prolonged periods of time. Here, we studied the role of Rab3 interacting molecule-binding proteins (RIM-BP) 1 and 2 – multidomain proteins of the active zone known to directly interact with RIMs, Bassoon and Ca_v1.3 – in IHC presynaptic function and hearing. Recordings of auditory brainstem responses and otoacoustic emissions revealed that genetic disruption of RIM-BPs 1 and 2 in mice (*RIM-BP1/2*^{-/-}) causes a synaptopathic hearing impairment exceeding that found in mice lacking RIM-BP2 (*RIM-BP2*^{-/-}). Patch-clamp recordings from *RIM-BP1/2*^{-/-} IHCs indicated a subtle impairment of exocytosis from the readily releasable pool of synaptic vesicles that had not been observed in *RIM-BP2*^{-/-} IHCs. In contrast, the reduction of Ca²⁺-influx and sustained exocytosis was similar to that in *RIMBP2*^{-/-} IHCs. We conclude that both RIM-BPs are required for normal sound encoding at the IHC synapse, whereby RIM-BP2 seems to take the leading role.

Keywords: RIM-BP, calcium, exocytosis, active zone (AZ), cochlea, hearing, ribbon synapse

INTRODUCTION

The ribbon-type active zones (AZ) of inner hair cells (IHCs) are molecularly specialized to ensure temporally precise encoding of incoming sound stimuli into high-frequency firing of postsynaptic spiral ganglion neurons (SGNs). In mature mouse IHCs, neurotransmitter release from synaptic vesicles (SV) is controlled by the tight spatial coupling of Ca_v1.3 voltage-gated L-type Ca²⁺-channels and the SV release machinery (Brandt et al., 2005; Wong et al., 2014; Pangrsic et al., 2015). A small, defined SV pool with fast release kinetics, referred to as the readily releasable pool (RRP), is much less sensitive to the slow-binding Ca²⁺-buffer EGTA than to the fast-binding Ca²⁺-buffer BAPTA, emphasizing the Ca²⁺-nanodomain-like control of SV release (Moser and Beutner, 2000; Brandt et al., 2005; Pangrsic et al., 2015). There is also evidence for Ca²⁺ nanodomain-like coupling in hair cells of other species, such as in frog auditory hair cells (Graydon et al., 2011), in rat IHCs

(Goutman and Glowatzki, 2007) and IHCs of the low frequency apical cochlea of the gerbil, while a looser Ca^{2+} microdomain-like coupling was reported for the high-frequency basal IHCs (Johnson et al., 2017) and immature mouse IHCs (Wong et al., 2014).

Aside from the sophisticated Ca^{2+} -channel complex (reviewed in Pangrsic et al., 2018), the release of SVs in auditory IHCs also requires a finely coordinated, complex presynaptic protein network including bassoon, piccolo, Rab3-interacting molecule (RIM) $2\alpha/2\beta/3\gamma$ and RIM-binding protein (RIM-BP), organizing the precise AZ topography of Ca^{2+} -channels and SV release sites (reviewed in Moser et al., 2019). RIM-BPs seem to take a central role in a large presynaptic multiprotein-complex involving voltage-gated Ca^{2+} -channels, RIMs and bassoon (Hibino et al., 2002; Kaeser et al., 2011; Davydova et al., 2014; Acuna et al., 2015; Ortner et al., 2020). Specifically, the RIM-BPs' two C-terminal SH3 domains interact with proline-rich motifs in the C-terminus of the $\text{Ca}_v\alpha_{1D}$ subunit and RIMs (Wang et al., 2000; Hibino et al., 2002; Kaeser et al., 2011; Ortner et al., 2020; Petzoldt et al., 2020), while the N-terminal SH3 domain interacts with the proline-rich motif of bassoon (Davydova et al., 2014). Morphological and functional studies from mouse IHCs suggest that these interactions are likely also applicable to IHC ribbon-type AZs. On the one hand, super-resolution microscopy studies on immunolabeled IHCs showed a specific stripe-like arrangement of the above mentioned interaction partners bassoon (Wong et al., 2014; Neef et al., 2018), RIM2 (Jung et al., 2015), RIM-BP2 (Krinner et al., 2017), and $\text{Ca}_v1.3$ Ca^{2+} -channels (Frank et al., 2010; Neef et al., 2018) at IHC AZs. On the other hand, the individual genetic deletion of bassoon (Khimich et al., 2005; Frank et al., 2010; Neef et al., 2018), RIM2 α and β (Jung et al., 2015) and RIM-BP2 (Krinner et al., 2017) significantly reduced the number of IHC presynaptic $\text{Ca}_v1.3$ Ca^{2+} -channels. While these data show that all three proteins are important for Ca^{2+} -channel clustering, none of the mentioned mutants exhibit a complete loss of synaptic $\text{Ca}_v1.3$ Ca^{2+} -channels or exocytosis, suggesting partially overlapping and compensatory function between these presynaptic AZ proteins to ensure normal presynaptic IHC function. In the retina, for example, RIMs were found to be upregulated upon loss of RIM-BP1/2 (Luo et al., 2017), while nonetheless a significant reduction of synaptic Ca^{2+} -channels was observed at rod bipolar cell ribbon-type AZs (Luo et al., 2017). The spectrum of effects of RIM-BP deletion on presynaptic function ranges across synapses. In *Drosophila melanogaster* neuromuscular junctions (NMJ), genetic disruption of DRPB (RIM-BP orthologue) causes a severe impairment of Ca^{2+} -channel clustering (Liu et al., 2011; Müller et al., 2015), while at conventional synapses of the mammalian CNS or *Caenorhabditis elegans* synapses, the number of P/Q- or N-type Ca^{2+} -channels was not affected by the loss of RIM-BPs (Acuna et al., 2015; Grauel et al., 2016; Kushibiki et al., 2019). Genetic disruption of DRPB in *D. melanogaster* NMJ further affected the structural AZ integrity and functional coupling between Ca^{2+} -channels and SVs, resulting in a drastically reduced SV release probability (Liu et al., 2011; Müller et al., 2015). Such looser SV- Ca^{2+} -channel coupling upon RIM-BP-disruption was also observed in conventional CNS synapses and

retinal ribbon synapses (Acuna et al., 2015; Grauel et al., 2016; Luo et al., 2017), whereas the tight nanodomain-like coupling remained unaltered in IHC ribbon synapses at least after recovery of the RRP from depletion (Krinner et al., 2017).

RIM-BPs also contribute to the efficient replenishment of readily releasable SVs. In *D. melanogaster* NMJ, the N-terminal deletion of DRBP lead to impaired SV recruitment to release sites, mediated via DRBP – Bruchpilot (BRP)/ELKS/CAST interaction (Petzoldt et al., 2020). Impaired SV replenishment was also reported for calyx of Held (Acuna et al., 2015) and ribbon synapses (Krinner et al., 2017; Luo et al., 2017). For IHC AZs, this has been suggested to reflect a role of RIM-BP2 in registering new-coming SVs in nanoscale proximity of Ca^{2+} channels (Krinner et al., 2017). Recently, a role of RIM-BP in SV priming via interaction with Munc13-1 has been suggested (Brockmann et al., 2020). As priming of SVs in IHCs seems to operate without Munc13 and CAPS priming proteins (Vogl et al., 2015), other protein interactions such as the one with CAST/ELKS (Petzoldt et al., 2020) remain to be studied for a potential involvement in SV replenishment. In support of the relevance of this interaction at mammalian synapses, we note that RIM-BP expression levels are linked to CAST/ELKS abundance. In hippocampal neurons, ELKS and RIM deletion caused reduced protein levels of RIM-BP2 (Wang et al., 2016), while ELKS was found to be upregulated in RIM-BP1/2 deficient retinae (Luo et al., 2017).

In vivo experiments on RIM-BP2 knockout mice (RIM-BP2 $^{-/-}$) revealed a mild synaptopathic hearing impairment (Krinner et al., 2017). Likewise, the genetic deletion of the above mentioned AZ proteins and RIM-BP interaction partners bassoon (Khimich et al., 2005) and RIM2 α (Jung et al., 2015) caused a significant, yet limited, elevation of hearing thresholds. Hence, the auditory system phenotype suggests overlapping and compensatory function of these AZ proteins, which is in agreement with the cell physiology. Yet, the consequences of RIM-BP2 loss-of-function might have been attenuated by the presence of other RIM-BP variants, such as RIM-BP1 or -3. Hence, we tested the presence and potential role of RIM-BP1 in cochlear function by comparing RIM-BP1/2 double-knockout mouse line (RIM-BP1/2 $^{-/-}$) (Grauel et al., 2016), to the previously studied RIM-BP2 $^{-/-}$ mice (Krinner et al., 2017). We employed expression analysis, electrophysiology and systems physiology and, indeed, found a synaptopathic hearing impairment in RIM-BP1/2 $^{-/-}$ mice that exceeds that of RIM-BP2 $^{-/-}$ mice. In IHC physiology, additional deletion of RIM-BP1 caused a subtle impairment of RRP exocytosis not found in RIM-BP2 $^{-/-}$ IHCs, suggesting that both RIM-BPs (-1 and -2) are required for normal hearing and sound encoding at the IHC ribbon synapse.

MATERIALS AND METHODS

Animals

RIM-BP1/2 double-knockout mice (RIM-BP1/2 $^{-/-}$) (Grauel et al., 2016) and C57BL/6 mice of either sex were used for experiments. Previously published data from RIM-BP2 knockout mice (RIM-BP2 $^{-/-}$) and their RIM-BP2 wild-type

littermates (*RIM-BP2^{+/+}*) were used for comparison as indicated (Krinner et al., 2017). Electrophysiology, RNAscope and immunohistochemistry experiments were performed in 2–3 week-old mice (i.e. after hearing-onset). Systems physiology was carried out in 8–10 week-old mice. All experiments complied with national animal care guidelines and were approved by the University of Göttingen board for animal welfare and the animal welfare office of the state of Lower Saxony.

Immunohistochemistry and Confocal Microscopy

Immunohistochemistry was carried out essentially as described in Khimich et al. (2005). If not stated differently, all steps were carried out at room temperature. Apical turns of 2–3 week-old *RIM-BP1/2^{-/-}* and *C57BL/6* mouse organs of Corti were dissected in phosphate buffered saline (PBS) and fixed with 4% formaldehyde (FA) in PBS on ice for 10 min. After fixation, the organs of Corti were washed 3 × 10 min in PBS and incubated in goat serum dilution buffer (GSDB: 16.7% normal goat serum, 450 mM NaCl, 0.3% Triton X-100, 20 mM phosphate buffer, pH 7.4) in a wet chamber. Thereafter, primary antibodies were applied overnight in a wet chamber at 4°C. After washing the organs of Corti 3 × 10 min (wash buffer: 450 mM NaCl, 20 mM phosphate buffer, 0.3% Triton X-100), they were incubated with secondary antibodies for 1 h in a wet and light-protected chamber. Finally, organs of Corti were washed 3 × 10 min in wash buffer, 10 min in 5 mM phosphate buffer and mounted on glass microscopy slides with a drop of fluorescence mounting medium (Mowiol). The following antibodies have been used: mouse-IgG1-anti-CtBP2 (also recognizing the ribbon protein RIBEYE, BD Biosciences, 1:200), guinea pig-anti-synapsin1/2 (Synaptic Systems, 1:500), guinea pig-anti-bassoon (Synaptic Systems, 1:500), rabbit-anti-RIM-BP1 (Synaptic Systems, 1:200), rabbit-anti-calretinin (Swant, 1:1,000) and AlexaFluor647 goat-anti-rabbit (Invitrogen, 1:200), STAR470spx-, STAR580-, and Star635P-labeled goat-anti-rabbit, goat-anti-mouse and goat-anti-guinea pig antibodies (Abberior, 1:200). All antibodies were diluted in GSDB. Mutant and wild-type samples were treated in parallel. Confocal images were acquired with 488, 561, and 640 nm excitation lasers, and a 100× oil immersion objective (1.4 NA, Olympus) using an Abberior Expert Line STED microscope (Abberior Instruments, Göttingen, Germany). Images were acquired, using identical laser power and microscope settings. Images were analyzed using ImageJ and assembled in Adobe Illustrator software.

RNAscope

Cochleae from 2-week-old *C57BL/6* mice were fixed for 2 h on ice in 4% FA in DEPC-treated PBS. Apical turns of the organs of Corti were dissected in DEPC-treated PBS. Free floating organs of Corti were dehydrated with EtOH (1 × 50% 5 min, 1 × 70% 5 min, 2 × 100% 5 min) and left to dry for a few minutes. The RNAscope assay was performed in accordance with the manufacturer's protocol (RNAscope® Multiplex Reagent Kit

User Manual, 320293-USM, ACDBio). Protease III was applied and incubated for 30 min at 40°C. Afterward, samples were washed twice for 5 min in water (DEPC-treated, autoclaved). The probes (RIM-BP1-C1, Otoferlin-C2, ACDBio) were applied (1:50 dilution, 50–70 μl) and incubated for 2 h at 40°C. Tissue was washed twice with wash buffer for 2 min. Finally, amplification steps were performed at 40°C: Amp 1-FL 30 min, Amp 2-FL 15 min, Amp 3-FL 30 min, Amp 4-FL (Variant A: RIM-BP1-C1 with Alexa 488 fluorophore, Otoferlin-C2 with ATTO 550 fluorophore) 15 min. Samples were washed in wash buffer for 2 min and twice in PBS for 2 min. Then, immunohistochemistry and confocal imaging were performed as described above. The RIM-BP1 RNAscope probe was custom made by ACDBio targeting the region 5565–5927 of RIM-BP1 (NM_172449.2).

RT-PCR and Single-Cell Nested RT-PCR

C57BL/6 mice at the age of postnatal days (p) 14 through 16 were used to determine the general expression of RIM-BPs in the organ of Corti and in single IHCs. For RT-PCR of organs of Corti we isolated total RNA from preparations of the organ of Corti and brain (control) using TRIzolReagent (Invitrogen). Reverse transcription was performed with SuperScriptII RT according to the manufacturer's instructions using oligo (dT) primers. Sequences of RIM-BP-specific primers are listed in **Table 1** and only the first PCR was run with less than 30 cycles. For single-cell PCR, individual IHCs from the apical coils of freshly dissected organs of Corti were harvested after cleaning off supporting cells at a high bath perfusion rate (3 ml/min). Ten IHCs per trial were collected to check the expression of RIM-BP1 and -2. Each individual IHC was aspirated into a glass pipette and the pipette content was transferred into first strand cDNA synthesis mix containing after the dilution: 50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 75 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 100 units of SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, United States) and 40 units RNaseOUT Ribonuclease inhibitor (Invitrogen). Reverse transcription was performed with oligo (dT) primers according to the manufacturer's instructions. Each cDNA mix was used as a template for two subsequent PCR reactions with nested primers specific for RIM-BP1 or RIM-BP2 cDNA. Instead of cDNA, distilled water was used in the negative control reaction. Single-cell nested RT-PCR was performed three times.

TABLE 1 | Primers for nested RT-PCR.

	1st	Nested
RIM-BP1 forward	TGGGCAAGGAAGGTC CCCAGT	GATGCCTCGCGCA ACCAGC
RIM-BP1 reverse	TCCTCCACCAGGCG GGCATT	GCAGAGCTCAGACTC CAGCTGC
RIM-BP2 forward	CCTGGCCTTCCTCAATG CCAAGC	GAGCATGAAGGTGCTG TGCAGCT
RIM-BP2 reverse	GTTGTAAGTGTAGCGGG CCACACAC	CGGTCATTGTCCATC TOGGACT

Patch-Clamp Recordings From Inner Hair Cells and Analysis

Perforated patch-clamp recordings were essentially carried out as described in Moser and Beutner (2000). Apical turns of 2–3 week-old *RIM-BP1/2^{-/-}* mouse organs of Corti were freshly dissected and whole-cell Ca^{2+} -current and exocytosis from IHCs were recorded at room temperature (22–24°C). The extracellular patch-clamp solution contained (in mM): 110 NaCl, 35 TEA-Cl, 2.8 KCl, 2 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 10 NaOH-HEPES, 11.3 D-glucose, pH 7.3. The internal pipette solution contained (in mM): 130 Cs-gluconate, 10 TEA-Cl, 10 4-AP, 10 HEPES, 1 MgCl_2 , amphotericin B (300 $\mu\text{g}/\text{ml}$), pH 7.2. The patch-clamp used an EPC-10 amplifier and Patchmaster software (HEKA Elektronik, Lambrecht, Germany). Voltages were corrected for liquid junction potentials (14 mV) and currents were leak-corrected using a p/10 protocol. For analysis Igor Pro software (Wavemetrics, Lake Oswego) was used. For membrane capacitance (C_m) measurements, IHCs were stimulated by depolarizations to -14 mV with intervals of 60–120 s to allow for recovery of IHC exocytosis. For current-voltage relationships (IVs) measurements, currents were evoked by 10 ms step depolarizations to various potentials from -100 to $+30$ mV in 5 mV increments. IVs were calculated from the currents during the last 8 ms of the step depolarization. From these, fractional activation curves were calculated by calculating the Ca^{2+} conductance from the Ca^{2+} -current (I_{Ca}) as $G(V) = \frac{I_{\text{Ca}}}{(V - V_{\text{rev}})}$, with V the command potential and V_{rev} the reversal potential of the current obtained from the x -axis crossing of an extrapolating line fit to the currents from 6 to 26 mV. After normalizing these traces to the maximum conductance in the range of -20 to 10 mV, they were fit with a Boltzmann equation $G_n(V) = \frac{G_{n,\text{max}}}{1 + e^{\frac{V_{\text{half}} - V}{k}}}$ with $G_{n,\text{max}}$, the maximum conductance, V the command potential, V_{half} the voltage of half-maximal activation, and k the slope factor. We measured C_m changes (ΔC_m) using the Lindau-Neher technique (Lindau and Neher, 1988) as previously described (Moser and Beutner, 2000). Briefly, the exocytic ΔC_m was quantified as the difference of the averaged C_m 400 ms before and after the depolarization. To avoid impact of C_m -transients related to conductance or gating of ion channels on ΔC_m estimation (Moser and Beutner, 2000; Neef et al., 2007) we skipped the first 100 ms of post-depolarization C_m for estimating the average. Mean ΔC_m and Ca^{2+} -current estimates present grand averages calculated from the mean estimates of individual IHCs, where each depolarization was repeated 2–3 times. This avoided dominance of IHCs contributing more sweeps.

Systems Physiology: Auditory Brainstem Responses and Distortion Product Otoacoustic Emissions

Auditory brainstem responses (ABR) and distortion product otoacoustic emissions (DPOAE) were performed as described in Jing et al. (2013) and Strenzke et al. (2016). In this study, 8–10 week-old *RIM-BP1/2^{-/-}* mice were anesthetized with ketamine (125 mg/kg) and xylazine (2.5 mg/kg) i.p. and the core body temperature was maintained constant at 37°C using a heat

blanket (Hugo Sachs Elektronik–Harvard Apparatus). A TDT II System run by BioSig software (Tucker Davis Technologies) was used for stimulus generation, presentation, and data acquisition. With a JBL 2402 speaker, tone bursts (4/6/8/12/16/24/32 kHz, 10 ms plateau, 1 ms cos2 rise/fall) or clicks of 0.03 ms were presented ipsilaterally in the free field at 40 Hz (tone bursts) or 20 and 100 Hz (clicks). The difference potential between vertex and mastoid subdermal needles was amplified 50,000 times, filtered (400–4,000 Hz) and sampled at a rate of 50 kHz for 20 ms, 1,300 times, to obtain two mean ABR traces for each sound intensity. Hearing thresholds were determined with 10 dB precision as the lowest stimulus intensity that evoked a reproducible response waveform in both traces by visual inspection by two independent observers. For DPOAE, continuous primary tones [frequency $f_2 = 1.2 \cdot f_1$, intensity $I_2 = I_1 - 10$ decibel (dB) sound pressure levels (SPL)] were delivered through the MF1 speaker system (Tucker Davis Technologies) and a custom-made probe containing a MKE-2 microphone (Sennheiser). The microphone signal was amplified (DMX 6Fire, Terratec) and the DPOAE amplitude at $2 \cdot f_2 - f_1$ was analyzed by fast Fourier transformation using custom-written Matlab software (Mathworks). SPL are provided in dB SPL root mean square (RMS) (tonal stimuli) or dB SPL peak equivalent (clicks).

Statistical Data Analysis

For statistical data analysis, Igor Pro software (Wavemetrics) and Origin software (Originlab) were used. Normality of distribution was tested with the Jarque-Bera test and variances were compared with the F -test. Unpaired, two-tailed Wilcoxon rank test (Mann-Whitney U test) was used to compare non-normal data or data with unequal variances, else Student's t -test was employed. For patch-clamp capacitance, ABR and DPOAE data, a one-way ANOVA was used for multiple comparisons followed by *post hoc* Tukey's test. Data are presented as mean \pm SEM. Data from *RIM-BP1/2* double-knockout mice (*RIM-BP1/2^{-/-}*) are presented in magenta, data from *RIM-BP2* knockout mice (*RIM-BP2^{-/-}*) are presented in green, and data from their wildtype littermates (*RIM-BP2^{+/+}*) are presented in black.

RESULTS

RIM-BP1 Is Expressed in the Mouse Organ of Corti

Previous studies showed a localization of RIM-BP2 to ribbon-type AZs of IHCs and presynaptic terminals of efferent lateral olivocochlear neurons (Krinner et al., 2017; Ortner et al., 2020). Such RIM-BP2 immunofluorescence was abolished in *RIM-BP2*-deficient IHCs demonstrating a specific labeling by the RIM-BP2 antibody. Here, we tested the hypothesis of a comparable expression pattern of RIM-BP1 in the mouse organ of Corti. For that we performed immunolabeling and confocal microscopy of mouse IHCs with two different triple antibody stainings for RIM-BP1, CtBP2/RIBEYE (marking the presynaptic ribbon), and either the presynaptic density marker bassoon (Supplementary Figure 1A) or synapsin 1/2 (Supplementary Figure 1B), marking the conventional presynaptic terminals of

afferent lateral olivocochlear neurons (Safieddine and Wenthold, 1999). We found colocalizing immunofluorescence of RIM-BP1, CtBP2/RIBEYE and bassoon (Supplementary Figure 1A) as well as of RIM-BP1 with synapsin1/2 (Supplementary Figure 1B). Labeling for RIM-BP1, however, was also present in the RIM-BP1/2-deficient IHCs, questioning the antibody specificity. In an attempt to further clarify this issue, we investigated the expression of RIM-BP1 in IHCs on the mRNA level with two different approaches. We performed (i) the RNAscope mRNA detection assay using fluorescent RNA probes with consecutive immunohistochemistry (Supplementary Figure 2; Salehi et al., 2018) and (ii) nested RT-PCR from 2-week-old *C57Bl/6* mouse organs of Corti and individual IHCs (Supplementary Figure 3). In the nested RT-PCR, both RIM-BP1 and -2 were detected in brain tissue and the organ of Corti (Supplementary Figures 3A,B). However, while RIM-BP2 mRNA was detected in individual IHCs (Supplementary Figure 3B), RIM-BP1 was not (Supplementary Figure 3A). This finding is consistent with our results from the RNAscope assay using fluorescent RNA probes targeting RIM-BP1 (Supplementary Figure 2D) and Otoferlin (Supplementary Figure 2C) as a positive control and consecutive immunohistochemistry in which we used calretinin labelling (Supplementary Figure 2B) to visualize IHCs. While the Otoferlin RNA probe showed a clear signal around all IHC nuclei, the RIM-BP1 RNA probe resulted in sparse if any signal (Supplementary Figure 2A, merge image).

RIM-BP2 Dominates the Function of RIM-BPs at the IHC Ribbon Synapse

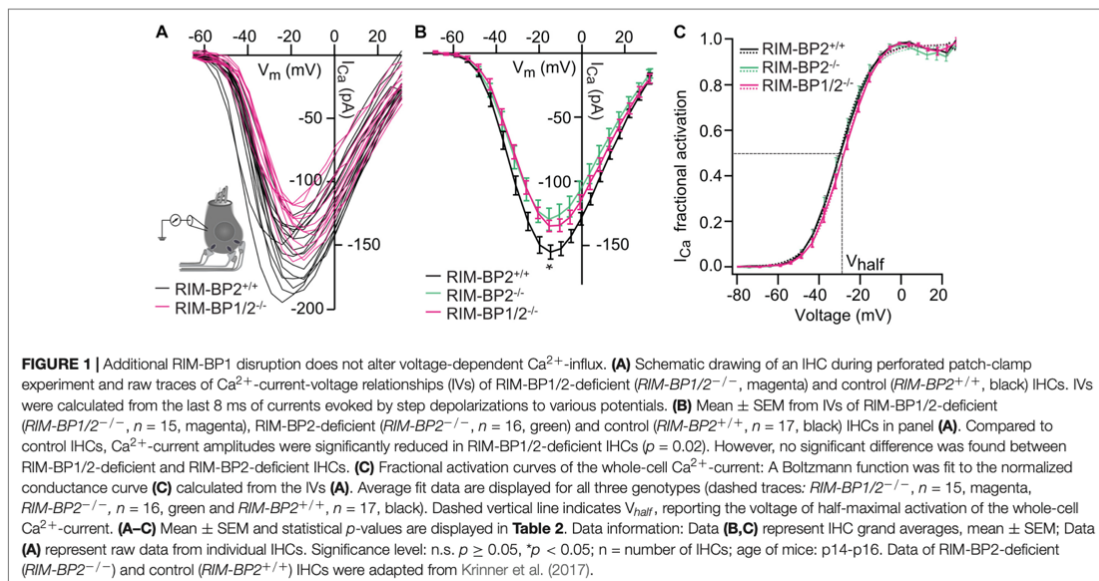
Next, we addressed the question, whether additional genetic disruption of RIM-BP1 in mice aggravates the deficit in presynaptic function of sensory IHCs beyond that found for RIM-BP2 single-knockout mice (*RIM-BP2*^{-/-}). Specifically, using constitutive RIM-BP1/2 double-knockout mice (*RIM-BP1/2*^{-/-}), we aimed to test whether RIM-BP1, just like RIM-BP2 (Krinner et al., 2017), promotes the synaptic Ca_v1.3 Ca²⁺-channel abundance and/or whether RIM-BP1 might directly regulate the exocytosis machinery. To address these points, we performed perforated-patch whole-cell recordings from IHCs of *RIM-BP1/2*^{-/-} mice to characterize IHC voltage-gated Ca²⁺-influx (Figure 1) and exocytosis (Figure 2). We compared the whole-cell Ca²⁺-current amplitude evoked by step depolarizations to various potentials of IHCs from mice lacking both RIM-BP1 and 2 (*RIM-BP1/2*^{-/-}) to IHCs from control mice (*RIM-BP2*^{+/+}) (Figure 1A), which was significantly reduced ($p = 0.02$; Wilcoxon rank test) (Figure 1B and Table 2). However, no statistically significant difference was found between the IHCs of *RIM-BP1/2*^{-/-} mice and *RIM-BP2*^{-/-} mice (data from Krinner et al., 2017). Further, consistent with the findings in RIM-BP2-deficient IHCs (Krinner et al., 2017), no difference in the voltage-dependence of Ca²⁺-channel activation was observed in RIM-BP1/2-deficient IHCs (Figure 1C and Table 2). The integral of the voltage-gated Ca²⁺-current (Q_{Ca}), obtained for step depolarizations of varying length, showed no significant reduction for RIM-BP1/2-deficient IHCs compared to control IHCs (*RIM-BP2*^{+/+}) and was comparable to RIM-BP2-deficient

IHCs (Figure 2B). Hence, while RIM-BP2 is a positive regulator of synaptic Ca_v1.3 Ca²⁺-channel abundance (Krinner et al., 2017) and stabilizes physiological gating properties of Ca_v1.3 Ca²⁺-channels (Ortner et al., 2020) at IHC ribbon synapses, RIM-BP1 seems to play a minor – if any – role in regulating the number of synaptic Ca_v1.3 Ca²⁺-channels.

In order to address the relevance of RIM-BP1 for IHC exocytosis, we measured the exocytic membrane capacitance changes (ΔC_m) in response to voltage-gated Ca²⁺-influx triggered by step depolarizations to -14 mV of varying length (Figure 2A). It is thought that short IHC depolarization durations up to 20 ms (Figure 2C) primarily trigger exocytic release of the RRP (Moser and Beutner, 2000), while longer IHC depolarization durations (>20 ms) (Figure 2B) also probe the sustained phase of SV release that involves SV replenishment to the RRP and subsequent SV fusion (Moser and Beutner, 2000; Schnee et al., 2005; Goutman and Glowatzki, 2007; Meyer et al., 2009; Neef et al., 2009). Sustained exocytosis was not significantly different in *RIM-BP1/2*^{-/-} IHCs when compared to control *RIM-BP2*^{+/+} IHCs or RIM-BP2-deficient IHCs (Figure 2B, p -values are summarized in Table 3). However, RRP exocytosis, probed by short depolarizations (≤ 20 ms, Figure 2C) was mildly but significantly reduced in RIM-BP1/2-deficient IHCs ($p_{5ms} = 0.003$, $p_{10ms} = 0.04$; one-way ANOVA and *post hoc* Tukey's test, Table 3), not seen in RIM-BP2-deficient IHCs (Krinner et al., 2017). The effect was largest for 5 ms step depolarizations, where also a significant difference between the RIM-BP1/2-deficient and RIM-BP2-deficient IHCs was detected ($p_{5ms} = 0.03$; one-way ANOVA and *post hoc* Tukey's test) (Figure 2C and Table 3). The reasons for not finding a significant reduction in sustained exocytosis in *RIM-BP1/2*^{-/-} IHCs that we previously found in *RIM-BP2*^{-/-} IHCs remain unclear. One might speculate that SVs not released by short depolarizations in *RIM-BP1/2*^{-/-} IHCs get recruited later, partially masking the SV replenishment deficit reported for *RIM-BP2*^{-/-} IHCs. Moreover, we note that cell-to-cell variability is high for exocytosis in response to longer stimuli, which might also contribute to this discrepancy. In conclusion, our data indicate that both RIM-BPs contribute to SV exocytosis at the IHC ribbon synapse. Among RIM-BPs at the IHC ribbon synapse, RIM-BP1 seems to be required for exocytosis of the RRP, while RIM-BP2 takes a prevailing role in clustering Ca²⁺-channels at the IHC AZ and enabling efficient SV replenishment (Krinner et al., 2017).

Both RIM-BP1 and 2 Are Required for Normal Hearing

Finally, we investigated whether additional genetic disruption of RIM-BP1 would cause a synaptopathic hearing impairment exceeding that found in mice lacking RIM-BP2 alone (Krinner et al., 2017). For that, we recorded ABRs from *RIM-BP1/2*^{-/-} mice. ABR waves reflect the compound neural action potential firing along the auditory pathway initiated at the first auditory synapse between sensory IHCs and SGNs. Hearing thresholds (Figure 3A) were determined as the lowest stimulus intensity that evoked a reproducible response ABR waveform. Compared to the hearing thresholds of *RIM-BP2*^{+/+} control mice, we



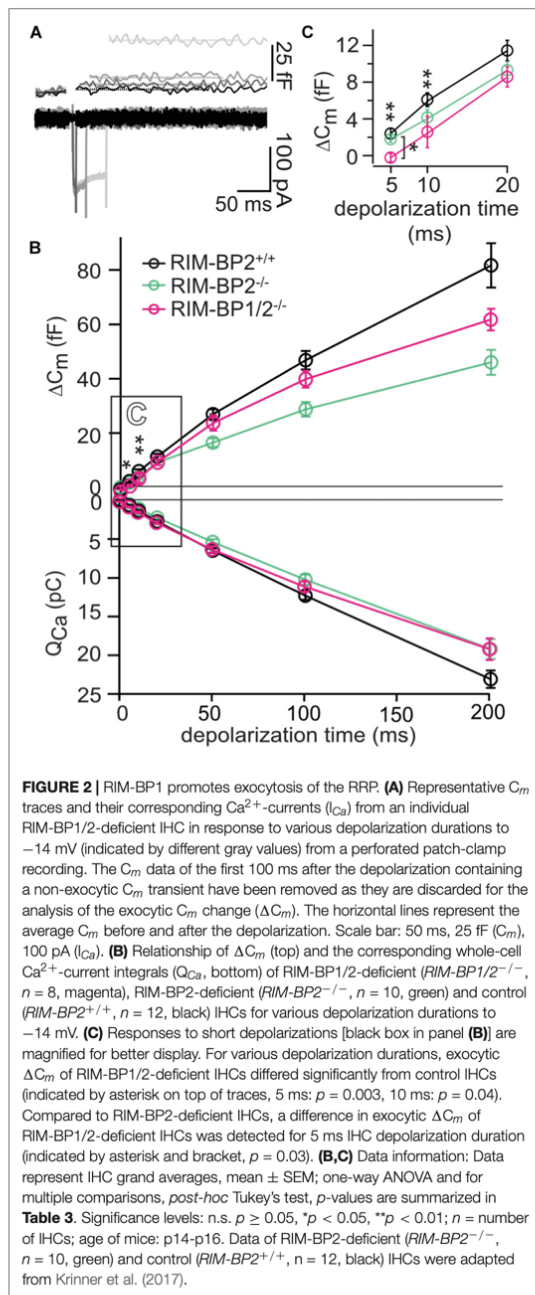
found a significant threshold elevation by on average 20 dB SPL ($\text{SD} \pm 4.0$ dB SPL) for all recorded frequencies in *RIM-BP1/2*^{-/-} mice ($p_{4\text{kHz}} = 0.0007$, $p_{6\text{kHz}} = 0.01$, $p_{8\text{kHz}} = 0.0001$, $p_{12\text{kHz}} < 0.0001$, $p_{16\text{kHz}} < 0.0001$, $p_{24\text{kHz}} = 0.002$, $p_{32\text{kHz}} = 0.003$; one-way ANOVA and *post hoc* Tukey's multiple comparison test). Interestingly, there was a significant threshold elevation also compared to *RIM-BP2*^{-/-} mice ($p_{12\text{kHz}} = 0.003$, $p_{16\text{kHz}} = 0.004$, $p_{24\text{kHz}} = 0.03$, $p_{32\text{kHz}} = 0.02$; one-way ANOVA and *post-hoc* Tukey's multiple comparison test). Along the same lines, the ABR wave amplitudes (**Figure 3B** and **Table 4**) were strongly reduced in *RIM-BP1/2*^{-/-} mice compared to *RIM-BP2*^{+/+} during 20 Hz click stimulation (wave I: *p* = 0.0006, wave III: *p* = 0.001, wave IV: *p* = 0.005; one-way ANOVA and *post-hoc* Tukey's multiple comparison test). When we compared the ABRs of *RIM-BP1/2*^{-/-} mice to *RIM-BP2*^{-/-} mice at 20 Hz click stimulation, we found a significant ABR wave amplitude decrease in wave IV (*p* = 0.03; one-way ANOVA and *post hoc* Tukey's multiple comparison test), which likely reflects additional deficits in synaptic transmission in the auditory brainstem. In addition, the ABR wave I amplitude difference between *RIM-BP1/2*^{-/-} mice and *RIM-BP2*^{-/-} mice reached statistical significance when increasing the rate click stimulation to 100 Hz (*p* = 0.03; one-way ANOVA and *post hoc* Tukey's multiple comparison test; **Table 4**). Since ABR wave I reflects synchronized firing of the SGNs induced by synaptic transmission from sensory IHCs, these data suggest a role of RIM-BP1 either in the sensory IHCs themselves or in the SGNs, downstream of the IHC ribbon synapse. To exclude that the hearing threshold elevation of RIM-BP1/2-deficient mice is caused by impaired outer hair cell-mediated cochlear amplification, we also recorded DPOAEs (**Figure 3C**). We found normal DPOAE amplitudes in *RIM-BP1/2*^{-/-} mice (for all F2 intensities: *p* > 0.05; one-way ANOVA and *post hoc*

Tukey's multiple comparison test), indicating preserved outer hair cell function, which is keeping with our previous findings in RIM-BP2-deficient mice (Krinner et al., 2017).

DISCUSSION

Here we probed for a role of RIM-BP1 in synaptic sound encoding at the IHC-SGN synapse. Building on our prior analysis of mice lacking RIM-BP2 (Krinner et al., 2017), we now studied the effects of additional deletion of RIM-BP1. *RIM-BP1/2*^{-/-} mice showed an aggravation of the auditory synaptopathy (Moser and Starr, 2016) phenotype, with further elevation of the hearing threshold and stronger reduction of ABR wave amplitudes than found in *RIM-BP2*^{-/-} mice, despite normal cochlear amplification. Our recent work suggests that, indeed, RIM-BP1 and 2 both play a role in mammalian hearing with a leading role of RIM-BP2 and partial functional redundancy of RIM-BP1 and 2. Scrutinizing the requirement for the presence of both RIM-BPs indicated a role for high frequency synaptic transmission *in vivo*, where the effect of additional RIM-BP1 deletion on ABR thresholds and amplitudes was enhanced at higher stimulation frequencies.

Mechanistically, such a hearing impairment could be caused by either a deficit in presynaptic transmitter release from sensory IHCs or a functional defect of the postsynaptic SGNs. On the presynaptic side, a reduction of IHC transmitter release could be caused indirectly via impaired Ca^{2+} -influx and/or directly via immediate effects on SV release. We found that at IHC ribbon synapses, additional deletion of RIM-BP1 did not further alter voltage-gated Ca^{2+} -influx beyond the reduction found in RIM-BP2 deficient IHCs. In contrast to our data on IHCs,



combined genetic deletion of RIM-BP1 and -2 in rod bipolar cell AZs, reduced the number of Ca^{2+} -channels more strongly than the deletion of the individual RIM-BPs (Luo et al., 2017).

The same study also showed a significant compensatory elevation of RIM protein levels in RIM-BP1/2-deficient retinæ (Luo et al., 2017). Other studies pointed toward redundant functions of RIMs and RIM-BPs in promoting the synaptic abundance of Ca^{2+} -channels: The combined deletion of RIMs and RIM-BPs reduced Ca^{2+} -channel abundance (Kushibiki et al., 2019) or Ca^{2+} -triggered release (Acuna et al., 2016) more drastically than would have been expected from the effects observed upon the deletion of individual genes. Since the impact of RIMs (Jung et al., 2015) and RIM-BP2 (Krinner et al., 2017) on synaptic $Ca_v1.3$ Ca^{2+} -channel abundance in IHCs has been shown, one could argue, that either RIM-BP1 has only a minor role on synaptic Ca^{2+} -channel abundance or that its effect was masked by an increased abundance of other AZ proteins like RIMs due to compensatory upregulation upon the combined loss of both RIM-BP1 and 2. Such compensatory upregulation of other multidomain proteins of the AZ should be tested in future studies that might also test the possibility of an upregulated expression of RIM-BP1 in RIM-BP2-deficient IHCs.

Then, the aggravation of the auditory synaptopathy observed in $RIM-BP1/2^{-/-}$ mice might point to a direct involvement of RIM-BP1 in SV exocytosis. Indeed, upon RIM-BP1/2 deletion, we found a subtle but significant reduction of synchronous SV exocytosis triggered by brief step-depolarizations not found in $RIM-BP2^{-/-}$ mice (**Figure 2B**) likely resulting in less synchronized SGN activation and, hence, smaller ABR wave I amplitude in $RIM-BP1/2^{-/-}$ mice (**Figure 3B**). A correspondence of impaired RRP exocytosis and reduced wave amplitude has previously been reported for bassoon-deficient IHCs (Khimich et al., 2005; Buran et al., 2010). However even though exocytosis is nearly completely abolished during *in vitro* capacitance measurements with 5 ms step depolarization, the ABR wave I recorded *in vivo* did not show such a dramatic amplitude reduction. We consider several possible and non-exclusive explanations for the discrepancy of the *in vivo* and *in vitro* data. (i) There is greater experimental variability at the level of *in vitro* patch-clamp recordings from individual IHCs containing just a dozen of synapses with stimulation repeated only 2–3 times per IHC, while ABR in response to 80 dB click reflect sound encoding of thousands of IHC-SGN synapse averaged over 1,000 trials. (ii) The age differs between the recordings of the *in vitro* patch-clamp C_m measurements (2–3 week-old mice) and the *in vivo* ABR measurements (8–10 week-old mice) which could influence synaptic transmission due to synapse maturation beyond 2–3 weeks. Morphological studies pointed out that cochlear thresholds and the subdivisions of SGNs according to their spontaneous firing rate are mature only after 28 days, which is especially critical for *in vivo* studies (Lieberman and Lieberman, 2016). (iii) The *in vitro* patch-clamp C_m measurements were done at room temperature, whereas ABR recordings were done at 37°C (mammalian body temperature). *In vitro* experiments done in frog and mammalian auditory hair cells showed, that at higher temperatures, the Ca^{2+} -current activation kinetics were accelerated and amplitudes increased, which reduces synaptic delay of glutamate release and supports synchronization of

TABLE 2 | Summary of Ca²⁺-current (I_{Ca}) data from perforated patch-clamp recordings.

	Amplitude (pA)	V _{half} (mV)	Slope factor k
RIM-BP2 ^{+/+} (n = 17)	-157 ± 6	-29.9 ± 0.9	6.9 ± 0.1
RIM-BP2 ^{-/-} (n = 16)	-126 ± 9	-30.0 ± 1.5	6.7 ± 0.2
RIM-BP1/2 ^{-/-} (n = 15)	-131 ± 1	-28.3 ± 0.1	6.9 ± 0.1
p-value(RIM-BP1/2 ^{-/-} vs. RIM-BP2 ^{+/+})	0.02* Wilcoxon rank test	0.3 Student's t-test	0.7 Wilcoxon rank test
p-value(RIM-BP1/2 ^{-/-} vs. RIM-BP2 ^{-/-})	0.7 Student's t-test	0.2 Student's t-test	0.4 Student's t-test

Summary of IHC grand average data from perforated patch-clamp recordings of Ca²⁺-currents (I_{Ca}) from RIM-BP1/2^{-/-}, RIM-BP2^{+/+} and RIM-BP2^{-/-} IHCs (Figure 1). Whole-cell I_{Ca} was analyzed regarding amplitude, voltage of half-maximal activation (V_{half}) and voltage-dependence of Ca²⁺-channel gating (slope factor k representing voltage-sensitivity of Ca²⁺-influx). Data represent IHC grand averages, mean ± SEM; n = number of IHCs; p-values and statistical test are depicted for each dataset, significance level: n.s. p ≥ 0.05, *p < 0.05. Data of RIM-BP2-deficient (RIM-BP2^{-/-}) and control (RIM-BP2^{+/+}) IHCs were adapted from Krinner et al. (2017).

SV release (Nouvian, 2007; Chen and von Gersdorff, 2019). In addition, the authors found a temperature-dependent increase in synchronous exocytosis, which was not only due to the accelerated Ca²⁺-current, but likely due to a temperature-dependent increase in efficiency of Ca²⁺ influx triggered SV exocytosis (Nouvian, 2007). These differences could explain the discrepancy between the strongly reduced response to 5 ms depolarization and the lesser reduction of ABR wave I amplitude. Thus, it would be interesting to perform the patch-clamp recordings at physiological temperature. (iv) The peak preceding wave I in Figure 3B is likely the summing potential (SP), thought to reflect the synchronous depolarization of IHCs (Whitfield and Ross, 1965; Dallos et al., 1972). That the SP is unaffected by loss of RIM-BP1 and/or RIM-BP2 indicated that the mechanotransduction machinery is unaffected, supporting a conclusion that the reduction in wave I amplitude is not due to a deficit upstream of the ribbon synapse, but rather reflects reduced activation of SGNs or desynchronization of SGN activation. Indeed, the link of RRP exocytosis in IHCs to synchronous SGN activation and ABR wave I amplitude has been established (Khimich et al., 2005; Wittig and Parsons, 2008; Buran et al., 2010; Rutherford et al., 2012; Li et al., 2014).

As for other synapses, RIM-BPs might be involved in a tight Ca²⁺-channel-SV coupling (Liu et al., 2011; Acuna et al., 2015; Grauel et al., 2016; Luo et al., 2017). While tight Ca²⁺-channel-SV coupling seems preserved in RIM-BP2^{-/-} IHCs at least after RRP recovery from depletion (Krinner et al., 2017), deletion of both RIM-BP1 and 2 might impair this coupling and, consequently, synchronous SV release (Figure 2C). Alternatively, subpools of the RRP might exist (Goutman and Glowatzki, 2007) and be differently dependent on RIM-BP1 and 2. Future experiments, e.g., using paired recordings (Goutman and Glowatzki, 2007) or dual color imaging of presynaptic Ca²⁺ signals and glutamate release (Özçete and Moser, 2020) should address these possibilities for individual IHC synapses. The better preserved sustained exocytosis in RIM-BP1/2^{-/-} double-knockout IHCs compared to RIM-BP2^{-/-} single knockout IHCs might then simply reflect a partial masking of impaired SV replenishment (Krinner et al., 2017) by the protracted release of the RRP in the absence of both RIM-BPs.

Another remaining task for future experiments is to further scrutinize RIM-BP1 expression in the organ of Corti. As described the RIM-BP1 antibodies at our disposal did not provide sufficient specificity to address this point. Interestingly, a recent transcript analysis of mouse IHCs reported expression of RIM-BP2 and -3, but not RIM-BP1 in IHCs (Ortner et al., 2020). This is consistent with our findings from two different approaches of expression analysis where we failed to detect RIM-BP1 mRNA in IHCs by single-cell RT-PCR and the RNAscope data did not strongly support RIM-BP1 mRNA expression in IHCs. However, our RT-PCR data showed a clear mRNA expression of RIM-BP1 in the organ of Corti. Future experiments should revisit a putative RIM-BP1 expression in IHCs e.g., by using RIM-BP1 specific immunolabeling or RNA sequencing of IHCs and also address a potential upregulated expression of RIM-BP1 in RIM-BP2-deficient IHCs. Moreover, alternative mechanisms explaining the aggravated hearing impairment found in RIM-BP1/2-deficient mice should be addressed which could involve a potential functional RIM-BP1 expression in SGNs or efferent olivocochlear neurons. If expressed in SGNs, it would be interesting to check for a putative postsynaptic function of RIM-BP1, e.g., by interacting and regulating postsynaptic receptor- or ion channel properties (Nirenberg and Yifrach, 2020). More speculatively, one could consider of a transsynaptic regulation from SGNs towards IHC AZs, leading to an impairment in synchronous exocytosis of the

TABLE 3 | Summary of statistical analysis of patch-clamp data.

	5 ms	10 ms	20 ms	50 ms	100 ms	200 ms
ΔC _m RIM-BP1/2 ^{-/-} vs. RIM-BP2 ^{+/+}	0.003**	0.04*	0.07	0.3	0.3	0.2
RIM-BP1/2 ^{-/-} vs. RIM-BP2 ^{-/-}	0.03*	0.5	0.8	0.2	0.2	0.3
Q _{real} RIM-BP1/2 ^{-/-} vs. RIM-BP2 ^{+/+}	0.6	0.9	0.6	0.3	0.3	0.07
RIM-BP1/2 ^{-/-} vs. RIM-BP2 ^{-/-}	0.3	0.1	0.1	0.6	0.6	0.9

Summary of statistical analysis of patch-clamp measurement data (Figure 2B): Membrane capacitance changes (ΔC_m, upper columns) and the corresponding whole-cell Ca²⁺-current integrals (Q_{Ca}, lower columns) during various depolarization durations (5–200 ms) were compared between IHCs of different genotypes: RIM-BP1/2-deficient (RIM-BP1/2^{-/-}, n = 8), RIM-BP2-deficient (RIM-BP2^{-/-}, n = 10) and control (RIM-BP2^{+/+}, n = 12). p-values from one-way ANOVA and post hoc Tukey's test; significance level: n.s. p ≥ 0.05, *p < 0.05, **p < 0.01. Data of RIM-BP2-deficient (RIM-BP2^{-/-}) and control (RIM-BP2^{+/+}) mice were adapted from Krinner et al. (2017).

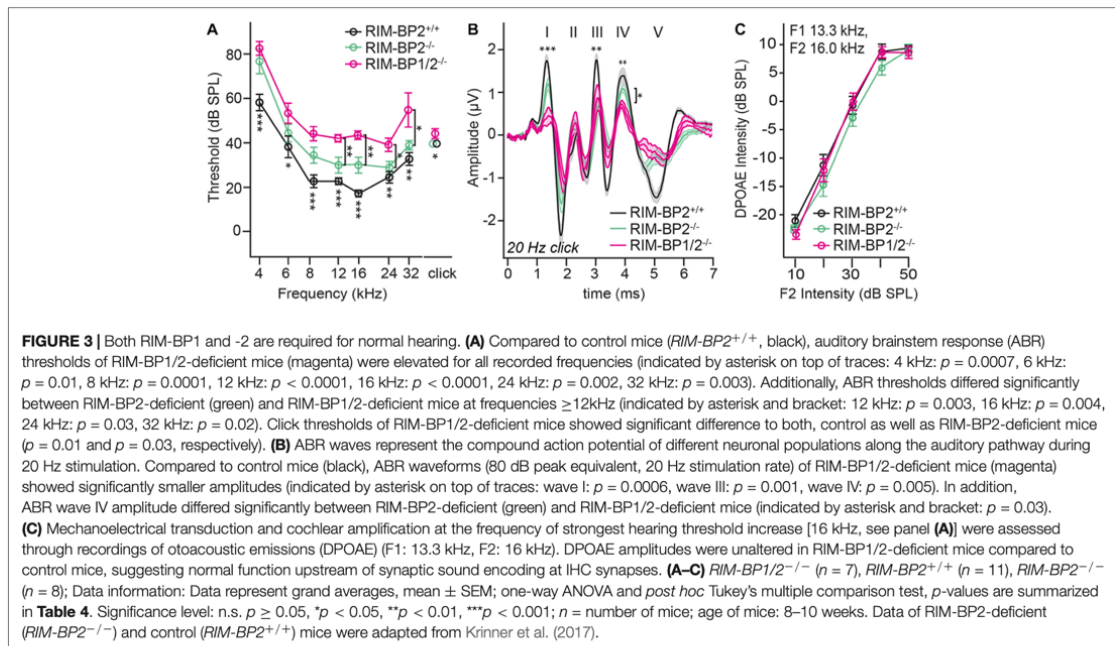


TABLE 4 | Summary of statistical analysis of ABR data.

		Wave I amplitude	Wave II amplitude	Wave III amplitude	Wave IV amplitude	Wave V amplitude
20 Hz	<i>RIM-BP1/2</i> ^{-/-} vs. <i>RIM-BP2</i> ^{+/+}	0.0006***	0.9	0.001**	0.005**	0.5
	<i>RIM-BP1/2</i> ^{-/-} vs. <i>RIM-BP2</i> ^{-/-}	0.2	0.9	0.6	0.03*	0.8
100 Hz	<i>RIM-BP1/2</i> ^{-/-} vs. <i>RIM-BP2</i> ^{+/+}	0.0004***	0.8	0.002**	0.002**	0.5
	<i>RIM-BP1/2</i> ^{-/-} vs. <i>RIM-BP2</i> ^{-/-}	0.03*	0.8	0.008**	0.05	0.7

Summary of statistical analysis of ABRs (**Figure 3B**): Wave I–V amplitudes were compared between *RIM-BP1/2*^{-/-} (*n* = 7), *RIM-BP2*^{+/+} (*n* = 11) and *RIM-BP2*^{-/-} (*n* = 8) mice for 20 or 100 Hz click stimulation. *p*-values from one-way ANOVA and *post hoc* Tukey's test; significance level: n.s. *p* \geq 0.05, **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001. Data of *RIM-BP2*-deficient (*RIM-BP2*^{-/-}) and control (*RIM-BP2*^{+/+}) mice were adapted from Krinner et al. (2017).

RRP in IHCs due to the loss of RIM-BP1. Such transsynaptic coupling of IHCs and SGNs was described for the AMPA receptor – PSD-95 complex, which is required for the correct spatial alignment of Ca_v1.3 Ca²⁺-channels across the synaptic cleft (Fell et al., 2016).

additional impairment of synchronous exocytosis of the readily releasable pool of synaptic vesicles. Hence, while RIM-BP2 appears to be the dominant isoform, both RIM-BPs are required for normal sound encoding at the inner hair cell ribbon synapse.

AUTHOR'S NOTE

RIM-binding proteins are multidomain proteins of the presynaptic active zone that interact with Ca²⁺ channels and other proteins forming release sites for synaptic vesicles. At the inner hair cell (IHC) ribbon synapse, RIM-BP2 tethers voltage-gated Ca²⁺-channels and promotes sustained exocytosis. In the present study, we probed for a function of RIM-BP1, another RIM-BP family member. We found that disruption of RIM-BPs 1 and 2 in mice causes a synaptopathic hearing impairment exceeding that of mice lacking only RIM-BP2. While the reduction of Ca²⁺-influx seemed comparable between IHCs of both mutant genotypes, deletion of both RIM-BPs caused an

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material, further inquiries can be directed to the corresponding author.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by University of Göttingen Board for Animal Welfare and Animal Welfare Office of the State of Lower Saxony. Written informed consent was obtained from the owners for the participation of their animals in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

SK and TM designed the study. SK performed immunohistochemistry, RNAscope and confocal microscopy, and patch-clamp capacitance measurements. FP performed RT-PCR experiments. DB and CV contributed to the RNAscope experiments. TM and SK prepared the manuscript with contributions of all authors.

FUNDING

This work was supported by grants of the German Research Foundation through the collaborative research centers 889 (project A02 to TM) and 1286 (project B05 to TM) and the Multiscale Bioimaging Cluster of Excellence (MBExC to TM). CV is a Creutzfeldt Fellow of the Elisabeth and Helmut Uhl Foundation. In addition, this research is supported by Fondation Pour l'Audition (FPA RD-2020-10).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Sandra Gerke, Christiane Senger-Freitag and Nadine Dietrich for expert technical assistance. We thank Drs. Christian Rosenmund, Katharina Grauel, and Stephan Sigrist for providing RIM-BP mutant mice. We thank Dr. Jakob Neef for general support of this project.

REFERENCES

- Acuna, C., Liu, X., Gonzalez, A., and Südhof, T. C. (2015). RIM-BPs mediate tight coupling of action potentials to Ca²⁺-Triggered neurotransmitter release. *Neuron* 87, 1234–1247. doi: 10.1016/j.neuron.2015.08.027
- Acuna, C., Liu, X., and Südhof, T. C. (2016). How to make an active zone: unexpected universal functional redundancy between RIMs and RIM-BPs. *Neuron* 91, 792–807. doi: 10.1016/j.neuron.2016.07.042
- Brandt, A., Khimich, D., and Moser, T. (2005). Few Ca_v1.3 channels regulate the exocytosis of a synaptic vesicle at the hair cell ribbon synapse. *J. Neurosci.* 25:11577. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3411-05.2005
- Brockmann, M. M., Zarebidaki, F., Camacho, M., Grauel, M. K., Trimbuch, T., Südhof, T. C., et al. (2020). A trio of active zone proteins comprised of RIM-BPs, RIMs, and Munc13s governs neurotransmitter release. *Cell Rep.* 32:107960. doi: 10.1016/j.celrep.2020.107960
- Buran, B. N., Strenzke, N., Neef, A., Gundelfinger, E. D., Moser, T., and Liberman, M. C. (2010). Onset coding is degraded in auditory nerve fibers from mutant mice lacking synaptic ribbons. *J. Neurosci.* 30, 7587–7597. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0389-10.2010
- Chen, M., and von Gersdorff, H. (2019). How to build a fast and highly sensitive sound detector that remains robust to temperature shifts. *J. Neurosci.* 39, 7260–7276. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2510-18.2019
- Dallos, P., Schoeny, Z. G., and Cheatham, M. A. (1972). Cochlear summating potentials. Descriptive aspects. *Acta Otolaryngol. Suppl.* 302, 1–46.
- Davydova, D., Marini, C., King, C., Klueva, J., Bischof, F., Romorini, S., et al. (2014). Bassoon specifically controls presynaptic P/Q-type Ca_v(2+) channels via RIM-binding protein. *Neuron* 82, 181–194. doi: 10.1016/j.neuron.2014.02.012
- Fell, B., Eckrich, S., Blum, K., Eckrich, T., Hecker, D., Obermair, G. J., et al. (2016). α 282 controls the function and trans-synaptic coupling of Cav1.3 channels in mouse inner hair cells and is essential for normal hearing. *J. Neurosci.* 36, 11024–11036. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3468-14.2016

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2021.651935/full#supplementary-material>

Supplementary Figure 1 | Efforts to establish immunohistochemistry for RIM-BP1 in the mouse cochlea. Maximum projections of confocal stacks after immunohistochemistry from apical organ of Corti whole-mount explants from 2-week-old *C57BL/6* and *RIM-BP1/2^{-/-}* mice. RIM-BP1 immunofluorescence (green) co-localizes with presynaptic ribbons (CtBP2/RIBEYE, magenta) and either (A) Bassoon (blue) or (B) Synapsin1/2 (blue) in *C57BL/6* IHCs. Synapsin1/2 marks presynaptic terminals of efferent lateral olivocochlear neurons projecting onto type I SGN synapses. RIM-BP1 is not absent in parallel processed *RIM-BP1/2^{-/-}* IHCs, questioning the RIM-BP1 antibody specificity. Scale bar: 5 μ m.

Supplementary Figure 2 | RNA Analysis of RIM-BP1 expression in the organ of Corti. Maximum projection of confocal stack after RNAscope experiment and consecutive immunohistochemistry from apical organ of Corti whole-mount explant from 2-week-old *C57BL/6* mouse. Calretinin (B), blue in merge image (A) marks IHCs. Otoferlin RNAscope probe (C), magenta in merge image (A) was used as positive control. Otoferlin mRNA is present in IHCs, mainly localized around the IHC nuclei. RIM-BP1 mRNA could not be detected by the RNAscope probe (D), green in merge image (A). Scale bar: 10 μ m.

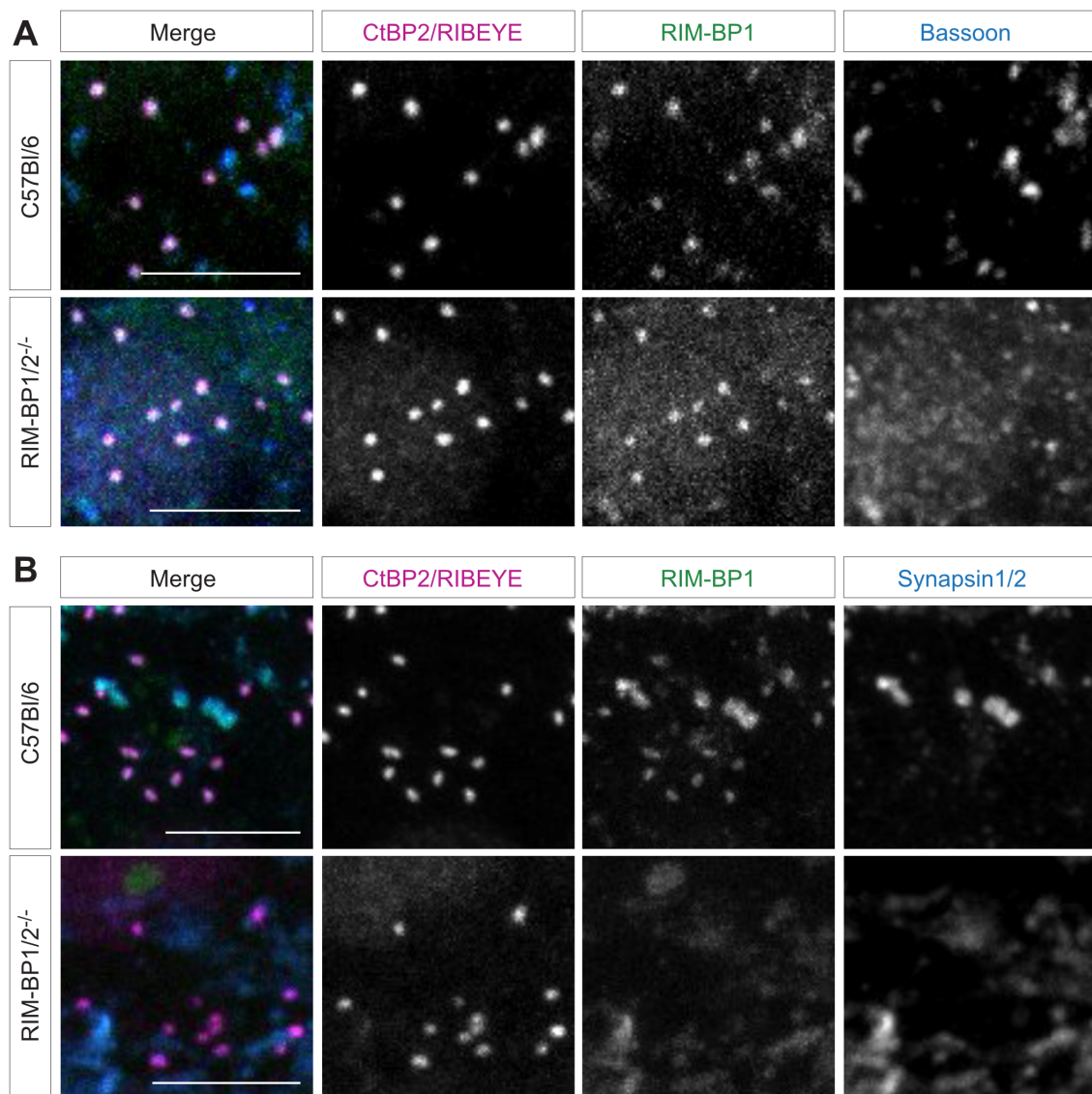
Supplementary Figure 3 | RIM-BP1 is expressed in the mouse organ of Corti. Nested RT-PCR from organs of Corti, brain, and 10 individual IHCs from 2-week-old *C57BL/6* mice. In the negative control cDNA was omitted from the reaction. Nested PCR primers were specific for RIM-BP1 (A) or RIM-BP2 (B) cDNA. The following DNA bands were expected: 196 bp for RIM-BP1 (A), 408 bp for RIM-BP2 (B). Both RIM-BPs were detected in brain tissue. RIM-BP2 mRNA was detected in individual IHCs. RIM-BP1 was detected in the organ of Corti, but not in individual IHCs.

- Frank, T., Rutherford, M. A., Strenzke, N., Neef, A., Pangršič, T., Khimich, D., et al. (2010). Bassoon and the synaptic ribbon organize Ca²⁺ channels and vesicles to add release sites and promote refilling. *Neuron* 68, 724–738. doi: 10.1016/j.neuron.2010.10.027
- Goutman, J. D., and Glowatzki, E. (2007). Time course and calcium dependence of transmitter release at a single ribbon synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 16341–16346. doi: 10.1073/pnas.0705756104
- Grauel, M. K., Maglione, M., Reddy-Alla, S., Willmes, C. G., Brockmann, M. M., Trimbuch, T., et al. (2016). RIM-binding protein 2 regulates release probability by fine-tuning calcium channel localization at murine hippocampal synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 11615–11620. doi: 10.1073/pnas.1605256113
- Graydon, C. W., Cho, S., Li, G.-L., Kachar, B., and von Gersdorff, H. (2011). Sharp Ca²⁺ nanodomains beneath the ribbon promote highly synchronous multivesicular release at hair cell synapses. *J. Neurosci.* 31, 16637–16650. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1866-11.2011
- Hibino, H., Pironkova, R., Onwumere, O., Vologodskaya, M., Hudspeth, A. J., and Lesage, F. (2002). RIM - binding proteins (RBPs) couple Rab3 - interacting molecules (RIMs) to voltage - gated Ca²⁺ channels. *Neuron* 34, 411–423. doi: 10.1016/S0896-6273(02)00667-0
- Jing, Z., Rutherford, M. A., Takago, H., Frank, T., Fejtova, A., Khimich, D., et al. (2013). Disruption of the presynaptic cytomatrix protein bassoon degrades ribbon anchorage, multiquantal release, and sound encoding at the hair cell afferent synapse. *J. Neurosci.* 33, 4456–4467. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3491-12.2013
- Johnson, S. L., Olt, J., Cho, S., von Gersdorff, H., and Marcotti, W. (2017). The coupling between Ca²⁺ Channels and the exocytotic Ca²⁺ Sensor at hair cell ribbon synapses varies tonotopically along the mature Cochlea. *J. Neurosci.* 37, 2471–2484. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2867-16.2017
- Jung, S., Oshima-Takago, T., Chakrabarti, R., Wong, A. B., Jing, Z., Yamanbaeva, G., et al. (2015). Rab3-interacting molecules α 2 and β promote the abundance

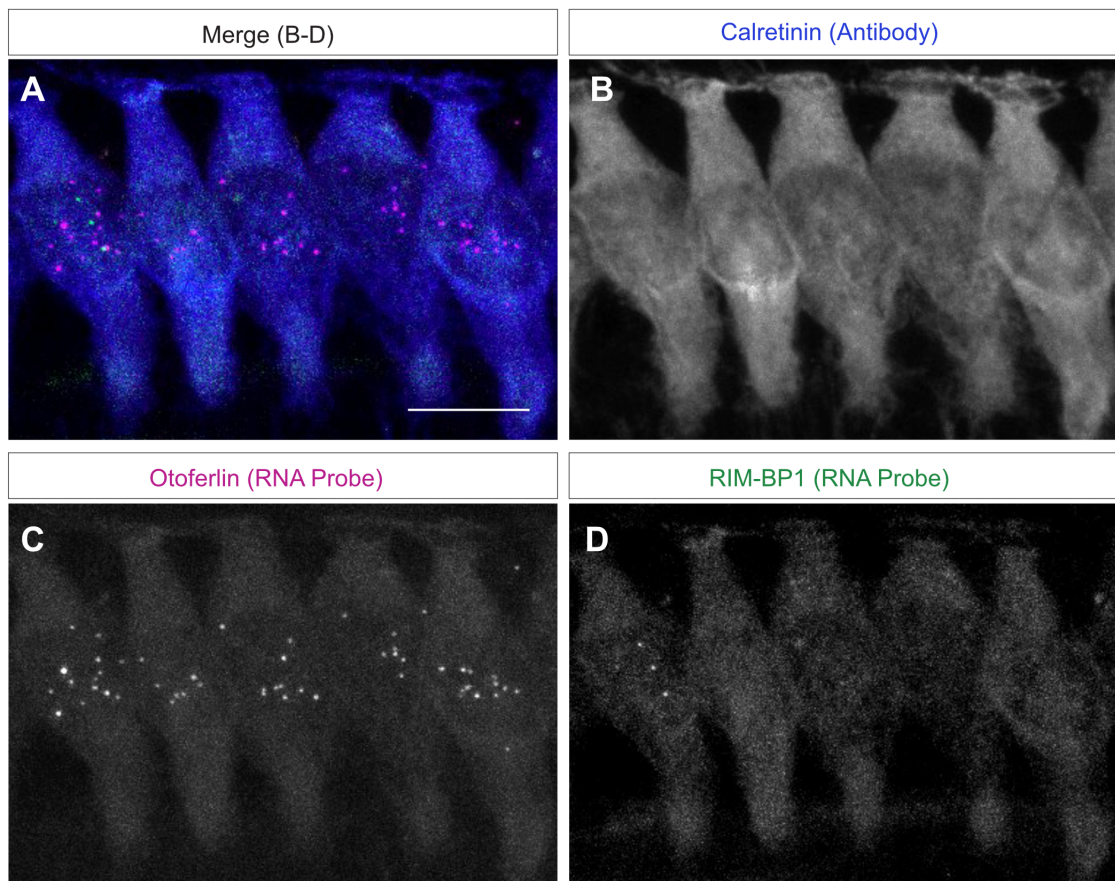
- of voltage-gated CaV1.3 Ca²⁺ channels at hair cell active zones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, E3141–E3149. doi: 10.1073/pnas.1417207112
- Kaesser, P. S., Deng, L., Wang, Y., Dulubova, I., Liu, X., Rizo, J., et al. (2011). RIM proteins tether Ca²⁺ channels to presynaptic active zones via a direct PDZ-domain interaction. *Cell* 144, 282–295. doi: 10.1016/j.cell.2010.12.029
- Khimich, D., Nouvian, R., Pujol, R., tom Dieck, S., Egner, A., Gundelfinger, E. D., et al. (2005). Hair cell synaptic ribbons are essential for synchronous auditory signalling. *Nature* 434, 889–894. doi: 10.1038/nature03418
- Krimmer, S., Butola, T., Jung, S., Wichmann, C., and Moser, T. (2017). RIM-Binding protein 2 promotes a large number of CaV1.3 Ca²⁺-Channels and contributes to fast synaptic vesicle replenishment at hair cell active zones. *Front. Cell. Neurosci.* 11:334. doi: 10.3389/fncel.2017.00334
- Kushibiki, Y., Suzuki, T., Jin, Y., and Taru, H. (2019). RIMB-1/RIM-Binding protein and UNC-10/RIM redundantly regulate presynaptic localization of the voltage-gated calcium channel in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.* 39, 8617–8631. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0506-19.2019
- Li, G.-L., Cho, S., and von Gersdorff, H. (2014). Phase-locking precision is enhanced by multiquantal release at an auditory hair cell ribbon synapse. *Neuron* 83, 1404–1417. doi: 10.1016/j.neuron.2014.08.027
- Lieberman, L. D., and Liberman, M. C. (2016). Postnatal maturation of auditory-nerve heterogeneity, as seen in spatial gradients of synapse morphology in the inner hair cell area. *Hear. Res.* 339, 12–22. doi: 10.1016/j.heares.2016.06.002
- Lindau, M., and Neher, E. (1988). Patch-clamp techniques for time-resolved capacitance measurements in single cells. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 411, 137–146. doi: 10.1007/BF00582306
- Liu, K. S. Y., Siebert, M., Mertel, S., Knoche, E., Wegener, S., Wichmann, C., et al. (2011). RIM-binding protein, a central part of the active zone, is essential for neurotransmitter release. *Science* 334, 1565–1569. doi: 10.1126/science.1212991
- Luo, F., Liu, X., Südhof, T. C., and Acuna, C. (2017). Efficient stimulus-secretion coupling at ribbon synapses requires RIM-binding protein tethering of L-type Ca²⁺ channels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, E8081–E8090. doi: 10.1073/pnas.1702991114
- Meyer, A. C., Frank, T., Khimich, D., Hoch, G., Riedel, D., Chapochnikov, N. M., et al. (2009). Tuning of synapse number, structure and function in the cochlea. *Nat. Neurosci.* 12, 444–453. doi: 10.1038/nn.2293
- Moser, T., and Beutner, D. (2000). Kinetics of exocytosis and endocytosis at the cochlear inner hair cell afferent synapse of the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 883–888. doi: 10.1073/pnas.97.2.883
- Moser, T., Grabner, C. P., and Schmitz, F. (2019). Sensory processing at ribbon synapses in the retina and the cochlea. *Physiol. Rev.* 100, 103–144. doi: 10.1152/physrev.00026.2018
- Moser, T., and Starr, A. (2016). Auditory neuropathy — neural and synaptic mechanisms. *Nat. Rev. Neurol.* 12, 135–149. doi: 10.1038/nrn.2016.10
- Müller, M., Genç, Ö., and Davis, G. W. (2015). RIM-binding protein links synaptic homeostasis to the stabilization and replenishment of high release probability vesicles. *Neuron* 85, 1056–1069. doi: 10.1016/j.neuron.2015.01.024
- Neef, J., Khimich, D., Pirih, P., Riedel, D., Wolf, F., and Moser, T. (2007). Probing the mechanism of exocytosis at the hair cell ribbon synapse. *J. Neurosci.* 27, 12933–12944. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1996-07.2007
- Neef, J., Gehrt, A., Bulankina, A. V., Meyer, A. C., Riedel, D., Gregg, R. G., et al. (2009). The Ca²⁺ Channel subunit beta2 regulates Ca²⁺ Channel abundance and function in inner hair cells and is required for hearing. *J. Neurosci.* 29:10730. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1577-09.2009
- Neef, J., Urban, N. T., Ohn, T.-L., Frank, T., Jean, P., Hell, S. W., et al. (2018). Quantitative optical nanophysiology of Ca²⁺ signaling at inner hair cell active zones. *Nat. Commun.* 9:290. doi: 10.1038/s41467-017-02612-y
- Nirenberg, V. A., and Yifrach, O. (2020). Bridging the molecular-cellular gap in understanding ion channel clustering. *Front. Pharmacol.* 10:1644. doi: 10.3389/fphar.2019.01644
- Nouvian, R. (2007). Temperature enhances exocytosis efficiency at the mouse inner hair cell ribbon synapse. *J. Physiol.* 584, 535–542. doi: 10.1113/jphysiol.2007.139675
- Ortner, N. J., Pinggera, A., Hofer, N. T., Siller, A., Brandt, N., Raffener, A., et al. (2020). RBP2 stabilizes slow Cav1.3 Ca²⁺ channel inactivation properties of cochlear inner hair cells. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 472, 3–25. doi: 10.1007/s00424-019-02338-4
- Özçete, ÖD., and Moser, T. (2020). A sensory cell diversifies its output by varying Ca²⁺ influx-release coupling among presynaptic active zones for wide range intensity coding. *EMBO Mol. Med.* 2020.06.06.137919. doi: 10.15252/embj.2020106010
- Pangrsic, T., Gabrielaitis, M., Michanski, S., Schwaller, B., Wolf, F., Strenzke, N., et al. (2015). EF-hand protein Ca²⁺ buffers regulate Ca²⁺ influx and exocytosis in sensory hair cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, E1028–E1037. doi: 10.1073/pnas.1416424112
- Pangrsic, T., Singer, J. H., and Koschak, A. (2018). Voltage-Gated calcium channels: key players in sensory coding in the retina and the inner ear. *Physiol. Rev.* 98, 2063–2096. doi: 10.1152/physrev.00030.2017
- Petzold, A. G., Götz, T. W. B., Driller, J. H., Lützkendorf, J., Reddy-Alla, S., Matkovic-Rachid, T., et al. (2020). RIM-binding protein couples synaptic vesicle recruitment to release sites. *J. Cell Biol.* 219:e201902059. doi: 10.1083/jcb.201902059
- Rutherford, M. A., Chapochnikov, N. M., and Moser, T. (2012). Spike encoding of neurotransmitter release timing by spiral ganglion neurons of the cochlea. *J. Neurosci.* 32, 4773–4789. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4511-11.2012
- Safedine, S., and Wenthold, R. J. (1999). SNARE complex at the ribbon synapses of cochlear hair cells: analysis of synaptic vesicle- and synaptic membrane-associated proteins. *Eur. J. Neurosci.* 11, 803–812. doi: 10.1046/j.1460-9568.1999.00487.x
- Salehi, P., Nelson, C. N., Chen, Y., Lei, D., Crish, S. D., Nelson, J., et al. (2018). Detection of single mRNAs in individual cells of the auditory system. *Hear. Res.* 367, 88–96. doi: 10.1016/j.heares.2018.07.008
- Schnee, M. E., Lawton, D. M., Furness, D. N., Benke, T. A., and Ricci, A. J. (2005). Auditory hair cell-afferent fiber synapses are specialized to operate at their best frequencies. *Neuron* 47, 243–254. doi: 10.1016/j.neuron.2005.06.004
- Strenzke, N., Chakrabarti, R., Al-Moyed, H., Müller, A., Hoch, G., Pangrsic, T., et al. (2016). Hair cell synaptic dysfunction, auditory fatigue and thermal sensitivity in otoferlin Ile515Thr mutants. *EMBO J.* 35:e201694564. doi: 10.15252/embj.201694564
- Vogl, C., Cooper, B. H., Neef, J., Wojcik, S. M., Reim, K., Reisinger, E., et al. (2015). Unconventional molecular regulation of synaptic vesicle replenishment in cochlear inner hair cells. *J. Cell Sci.* 128, 638–644. doi: 10.1242/jcs.162099
- Wang, S. S. H., Held, R. G., Wong, M. Y., Liu, C., Karakhanyan, A., and Kaesser, P. S. (2016). Fusion competent synaptic vesicles persist upon active zone disruption and loss of vesicle docking. *Neuron* 91, 777–791. doi: 10.1016/j.neuron.2016.07.005
- Wang, Y., Sugita, S., and Südhof, T. C. (2000). The RIM/NIM family of neuronal C2 domain proteins. Interactions with Rab3 and a new class of Src homology 3 domain proteins. *J. Biol. Chem.* 275, 20033–20044. doi: 10.1074/jbc.M909008199
- Whitfield, I. C., and Ross, H. F. (1965). Cochlear-microphonic and summing potentials and the outputs of individual hair-cell generators. *J. Acoust. Soc. Am.* 38, 126–131. doi: 10.1121/1.1909586
- Wittig, J. H. Jr., and Parsons, T. D. (2008). Synaptic ribbon enables temporal precision of hair cell afferent synapse by increasing the number of readily releasable vesicles: a modeling study. *J. Neurophysiol.* 100, 1724–1739. doi: 10.1152/jn.90322.2008
- Wong, A. B., Rutherford, M. A., Gabrielaitis, M., Pangrsic, T., Göttfert, F., Frank, T., et al. (2014). Developmental refinement of hair cell synapses tightens the coupling of Ca²⁺ influx to exocytosis. *EMBO J.* 33, 247–264. doi: 10.1002/embj.201387110

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

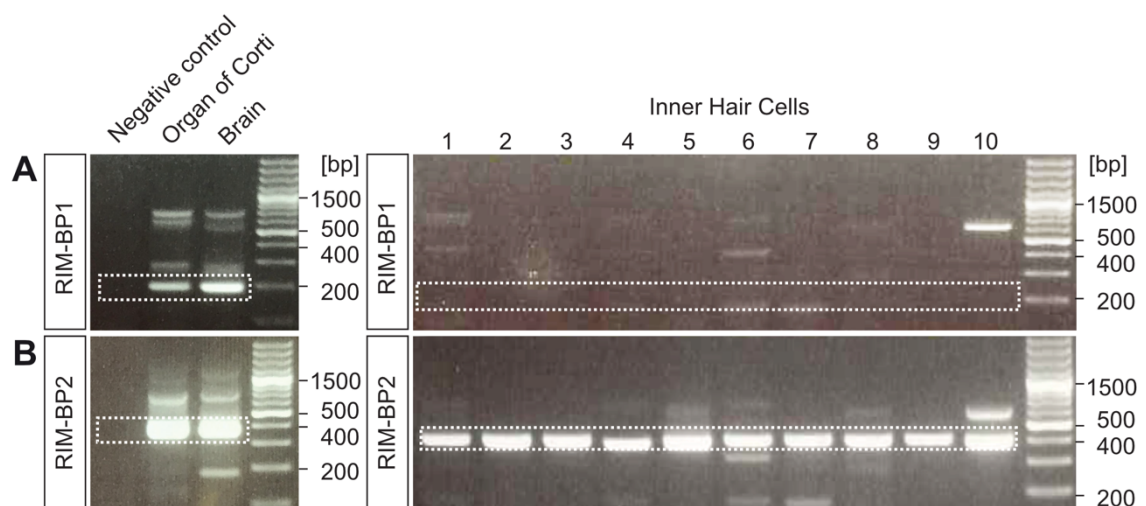
Copyright © 2021 Krimmer, Predoehl, Burfeind, Vogl and Moser. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Supplementary Figure 1 | Efforts to establish immunohistochemistry for RIM-BP1 in the mouse cochlea. Maximum projections of confocal stacks after immunohistochemistry from apical organ of Corti whole-mount explants from 2-week-old *C57BL/6* and *RIM-BP1/2^{-/-}* mice. RIM-BP1 immunofluorescence (green) colocalizes with presynaptic ribbons (CtBP2/RIBEYE, magenta) and either **(A)** Bassoon (blue) or **(B)** Synapsin1/2 (blue) in *C57BL/6* IHCs. Synapsin1/2 marks presynaptic terminals of efferent lateral olivocochlear neurons projecting onto type I SGN synapses. RIM-BP1 is not absent in parallel processed *RIM-BP1/2^{-/-}* IHCs, questioning the RIM-BP1 antibody specificity. Scale bar: 5 μ m.



Supplementary Figure 2 | RNA Analysis of RIM-BP1 expression in the organ of Corti. Maximum projection of confocal stack after RNAscope experiment and consecutive immunohistochemistry from apical organ of Corti whole-mount explant from 2-week-old *C57BL/6* mouse. Calretinin [(B), blue in merge image (A)] marks IHCs. Otoferlin RNAscope probe [(C), magenta in merge image (A)] was used as positive control. Otoferlin mRNA is present in IHCs, mainly localized around the IHC nuclei. RIM-BP1 mRNA could not be detected by the RNAscope probe [(D), green in merge image (A)]. Scale bar: 10 μ m.



Supplementary Figure 3 | RIM-BP1 is expressed in the mouse organ of Corti. Nested RT-PCR from organs of Corti, brain, and 10 individual IHCs from 2-week-old *C57BL/6* mice. In the negative control cDNA was omitted from the reaction. Nested PCR primers were specific for RIM-BP1 (A) or RIM-BP2 (B) cDNA. The following DNA bands were expected: 196 bp for RIM-BP1 (A), 408 bp for RIM-BP2 (B). Both RIM-BPs were detected in brain tissue. RIM-BP2 mRNA was detected in individual IHCs. RIM-BP1 was detected in the organ of Corti, but not in individual IHCs.

7 Literaturverzeichnis

Acuna C, Liu X, Gonzalez A, Südhof T (2015): RIM-BPs Mediate Tight Coupling of Action Potentials to Ca²⁺-Triggered Neurotransmitter Release. *Neuron* 87, 1234–1247

Acuna C, Liu X, Südhof T (2016): How to Make an Active Zone: Unexpected Universal Functional Redundancy between RIMs and RIM-BPs. *Neuron* 91, 792–807

Assad J, Shepherd G, Corey D (1991): Tip-link integrity and mechanical transduction in vertebrate hair cells. *Neuron* 7, 985–994

Baig S, Koschak A, Lieb A, Gebhart M, Dafinger C, Nürnberg G, Ali A, Ahmad I, Sinnegger-Brauns M, Brandt N, et al. (2011): Loss of Cav1.3 (CACNA1D) function in a human channelopathy with bradycardia and congenital deafness. *Nat Neurosci* 14, 77–84

Becker L, Schnee M, Niwa M, Sun W, Maxeiner S, Talaei S, Kachar B, Rutherford M, Ricci A (2018): The presynaptic ribbon maintains vesicle populations at the hair cell afferent fiber synapse. *eLife Sciences* 7, e30241

Brandt A, Striessnig J, Moser T (2003): Cav1.3 channels are essential for development and presynaptic activity of cochlear inner hair cells. *J Neurosci* 23, 10832–10840

Brandt A, Khimich D, Moser T (2005): Few Cav1.3 channels regulate the exocytosis of a synaptic vesicle at the hair cell ribbon synapse. *J Neurosci* 25, 11577

Buran B, Strenzke N, Neef A, Gundelfinger E, Moser T, Liberman M (2010): Onset coding is degraded in auditory nerve fibers from mutant mice lacking synaptic ribbons. *J Neurosci* 30, 7587–7597

Coppola T, Magnin-Lüthi S, Perret-Menoud V, Gattesco S, Schiavo G, Regazzi R (2001): Direct Interaction of the Rab3 Effector RIM with Ca²⁺ channels, SNAP-25, and Synaptotagmin. *J Biol Chem* 276, 32756–32762

Davydova D, Marini C, King C, Klueva J, Bischof F, Romorini S, Montenegro-Venegas C, Heine M, Schneider R, Schröder M, et al. (2014): Bassoon specifically controls presynaptic P/Q-type Ca²⁺ channels via RIM-binding protein. *Neuron* 82, 181–194

Dick O, tom Dieck S, Altmann W, Ammermüller J, Weiler R, Garner C, Gundelfinger E, Brandstätter J (2003): The Presynaptic Active Zone Protein Bassoon Is Essential for Photoreceptor Ribbon Synapse Formation in the Retina. *Neuron* 37, 775–786

Dou H, Vazquez A, Namkung Y, Chu H, Cardell E, Nie L, Parson S, Shin H, Yamoah E (2004): Null mutation of alpha1D Ca²⁺ channel gene results in deafness but no vestibular defect in mice. *J Assoc Res Otolaryngol* 5, 215–226

Frank T, Khimich D, Neef A, Moser T (2009): Mechanisms contributing to synaptic Ca²⁺ signals and their heterogeneity in hair cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 4483–4488

- Frank T, Rutherford M, Strenzke N, Neef A, Pangršič T, Khimich D, Fejtova A, Gundelfinger E, Liberman M, Harke B, et al. (2010): Bassoon and the synaptic ribbon organize Ca^{2+} channels and vesicles to add release sites and promote refilling. *Neuron* 68, 724–738
- Fuchs P, Lauer A (2018): Efferent Inhibition of the Cochlea. *Cold Spring Harb Perspect Med* 9, a033530
- Gebhart M, Juhasz-Vedres G, Zuccotti A, Brandt N, Engel J, Trockenbacher A, Kaur G, Obermair G, Knipper M, Koschak A, Striessnig J (2010): Modulation of $\text{Ca}_v1.3$ Ca^{2+} channel gating by Rab3 interacting molecule. *Mol Cell Neurosci* 44, 246–259
- Goutman J, Glowatzki E (2007): Time course and calcium dependence of transmitter release at a single ribbon synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 16341–16346
- Grauel M, Maglione M, Reddy-Alla S, Willmes CG, Brockmann M, Trimbuch T, Rosenmund T, Pangalos M, Vardar G, Stumpf A, et al. (2016): RIM-binding protein 2 regulates release probability by fine-tuning calcium channel localization at murine hippocampal synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 11615–11620
- Hibino H, Pironkova R, Onwumere O, Vologodskaja M, Hudspeth A, Lesage F (2002): RIM - binding proteins (RBPs) couple Rab3 - interacting molecules (RIMs) to voltage - gated Ca^{2+} channels. *Neuron* 34, 411–423
- Howard J, Hudspeth A (1988): Compliance of the hair bundle associated with gating of mechano-electrical transduction channels in the bullfrog's saccular hair cell. *Neuron* 1, 189–199
- Jean P, Morena D de la, Michanski S, Tobón L, Chakrabarti R, Picher M, Neef J, Jung S, Gültas M, Maxeiner S, et al. (2018): The synaptic ribbon is critical for sound encoding at high rates and with temporal precision. *Elife* 7, e29275
- Jung S, Oshima-Takago T, Chakrabarti R, Wong A, Jing Z, Yamanbaeva G, Picher M, Wojcik S, Göttfert F, Predoehl F, et al. (2015): Rab3-interacting molecules 2 α and 2 β promote the abundance of voltage-gated $\text{Ca}_v1.3$ Ca^{2+} channels at hair cell active zones. *Proc Natl Acad Sci USA* 112, E3141–E3149
- Kaesler P, Deng L, Wang Y, Dulubova I, Liu X, Rizo J, Südhof T (2011): RIM proteins tether Ca^{2+} channels to presynaptic active zones via a direct PDZ-domain interaction. *Cell* 144, 282–295
- Khimich D, Nouvian R, Pujol R, Tom Dieck S, Egner A, Gundelfinger E, Moser T (2005): Hair cell synaptic ribbons are essential for synchronous auditory signalling. *Nature* 434, 889–94

- Kiyonaka S, Wakamori M, Miki T, Uriu Y, Nonaka M, Bito H, Beedle A, Mori E, Hara Y, De Waard M, et al. (2007): RIM1 confers sustained activity and neurotransmitter vesicle anchoring to presynaptic Ca²⁺ channels. *Nat Neurosci* 10, 691–701
- Krinner S: Molecular physiology of synaptic sound encoding at the first auditory synapse. Naturwissenschaftl. Diss. Göttingen 2018
- Krinner S, Butola T, Jung S, Wichmann C, Moser T (2017): RIM-Binding Protein 2 Promotes a Large Number of Cav1.3 Ca²⁺-Channels and Contributes to Fast Synaptic Vesicle Replenishment at Hair Cell Active Zones. *Front Cell Neurosci* 11, 334
- Krinner S, Predoehl F, Burfeind D, Vogl C, Moser T (2021): RIM-Binding Proteins Are Required for Normal Sound-Encoding at Afferent Inner Hair Cell Synapses. *Front Mol Neurosci* 14, 651935
- Li G, Cho S, von Gersdorff H (2014): Phase-locking precision is enhanced by multiquantal release at an auditory hair cell ribbon synapse. *Neuron* 83, 1404–1417
- Lindau M, Neher E (1988): Patch-clamp techniques for time-resolved capacitance measurements in single cells. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 411, 137–146
- Liu KSY, Siebert M, Mertel S, Knoche E, Wegener S, Wichmann C, Matkovic T, Muhammad K, Depner H, Mettke C, et al. (2011): RIM-binding protein, a central part of the active zone, is essential for neurotransmitter release. *Science* 334, 1565–1569
- Luo F, Liu X, Südhof T, Acuna C (2017): Efficient stimulus-secretion coupling at ribbon synapses requires RIM-binding protein tethering of L-type Ca²⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, E8081–E8090
- Mansergh F, Orton N, Vessey J, Lalonde M, Stell W, Tremblay F, Barnes S, Rancourt D, Bech-Hansen N (2005): Mutation of the calcium channel gene *Cacna1f* disrupts calcium signaling, synaptic transmission and cellular organization in mouse retina. *Hum Mol Genet* 14, 3035–3046
- Maxeiner S, Luo F, Tan A, Schmitz F, Südhof T (2016): How to make a synaptic ribbon: RIBEYE deletion abolishes ribbons in retinal synapses and disrupts neurotransmitter release. *The EMBO Journal* 35, 1098–1114
- Melcher J, Guinan Jr J, Knudson I, Kiang N (1996): Generators of the brainstem auditory evoked potential in cat II. Correlating lesion sites with waveform changes. *Hearing research* 93, 28–51
- Meyer A, Frank T, Khimich D, Hoch G, Riedel D, Chapochnikov N, Yarin Y, Harke B, Hell S, Egner A, Moser T (2009): Tuning of synapse number, structure and function in the cochlea. *Nat Neurosci* 12, 444–453

- Moser T, Beutner D (2000): Kinetics of exocytosis and endocytosis at the cochlear inner hair cell afferent synapse of the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 883–888
- Moser T, Zenner H: Peripheres Auditorisches System. In: Brandes R, Lang F, Schmidt RF (Hrsg.): *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg 2019, 685–700
- Müller M, Genç Ö, Davis G (2015): RIM-binding protein links synaptic homeostasis to the stabilization and replenishment of high release probability vesicles. *Neuron* 85, 1056–1069
- Neef J, Gehrt A, Bulankina A, Meyer A, Riedel D, Gregg R, Strenzke N, Moser T (2009): The Ca²⁺ Channel Subunit beta2 Regulates Ca²⁺ Channel Abundance and Function in Inner Hair Cells and Is Required for Hearing. *J Neurosci* 29, 10730
- Neef J, Urban N, Ohn T, Frank T, Jean P, Hell S, Willig KI, Moser T (2018): Quantitative optical nanophysiology of Ca²⁺ signaling at inner hair cell active zones. *Nat Commun* 9, 290
- Nirenberg V, Yifrach O (2020): Bridging the Molecular-Cellular Gap in Understanding Ion Channel Clustering. *Front Pharmacol* 10, 1644
- Nouvian R, Neef J, Bulankina A, Reisinger E, Pangršič T, Frank T, Sikorra S, Brose N, Binz T, Moser T (2011): Exocytosis at the hair cell ribbon synapse apparently operates without neuronal SNARE proteins. *Nat Neurosci* 14, 411–413
- Ortner N, Pinggera A, Hofer N, Siller A, Brandt N, Raffener A, Vilusic K, Lang I, Blum K, Obermair G, et al. (2020): RBP2 stabilizes slow Cav1.3 Ca²⁺ channel inactivation properties of cochlear inner hair cells. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 472, 3–25
- Özçete Ö, Moser T (2020): A sensory cell diversifies its output by varying Ca²⁺ influx-release coupling among presynaptic active zones for wide range intensity coding. *EMBO Molecular Medicine* 2020.06.06.137919
- Pangrsic T, Reisinger E, Moser T (2012): Otoferlin: a multi-C-2 domain protein essential for hearing. *Trends Neurosci* 35, 671–680
- Pangrsic T, Gabrielaitis M, Michanski S, Schwaller B, Wolf F, Strenzke N, Moser T (2015): EF-hand protein Ca²⁺ buffers regulate Ca²⁺ influx and exocytosis in sensory hair cells. *P Natl Acad Sci USA* 112, E1028–E1037
- Petzoldt A, Götz T, Driller J, Lützkendorf J, Reddy-Alla S, Matkovic-Rachid T, Liu S, Knoche E, Mertel S, Ugorets V, et al. (2020): RIM-binding protein couples synaptic vesicle recruitment to release sites. *Journal of Cell Biology* 219, e201902059

- Platzer J, Engel J, Schrott-Fischer A, Stephan K, Bova S, Chen H, Zheng H, Striessnig J (2000): Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type Ca^{2+} channels. *Cell* 102, 89–97
- Rodríguez-Ballesteros M, del Castillo FJ, Martín Y, Moreno-Pelayo M, Morera C, Prieto F, Marco J, Morant A, Gallo-Terán J, Morales-Angulo C, et al. (2003): Auditory neuropathy in patients carrying mutations in the otoferlin gene (OTOF). *Human Mutation* 22, 451–456
- Rutherford MA, Chapochnikov N, Moser T (2012): Spike Encoding of Neurotransmitter Release Timing by Spiral Ganglion Neurons of the Cochlea. *J Neurosci* 32, 4773–4789
- Schmitz F, Königstorfer A, Südhof T (2000): RIBEYE, a component of synaptic ribbons: a protein's journey through evolution provides insight into synaptic ribbon function. *Neuron* 28, 857–872
- Schnee M, Lawton D, Furness D, Benke T, Ricci A (2005): Auditory hair cell-afferent fiber synapses are specialized to operate at their best frequencies. *Neuron* 47, 243–254
- Schneider C, Rasband W, Eliceiri K (2012): NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9, 671–675
- tom Dieck S, Altroch W, Kessels M, Qualmann B, Regus H, Brauner D, Fejtová A, Bracko O, Gundelfinger E, Brandstätter J (2005): Molecular dissection of the photoreceptor ribbon synapse: physical interaction of Bassoon and RIBEYE is essential for the assembly of the ribbon complex. *J Cell Biol* 168, 825–836
- Varga R, Kelley P, Keats B, Starr A, Leal S, Cohn E, Kimberling W (2003): Non-syndromic recessive auditory neuropathy is the result of mutations in the otoferlin (OTOF) gene. *J Med Genet* 40, 45–50
- Vogl C, Cooper B, Neef J, Wojcik S, Reim K, Reisinger E, Brose N, Rhee J, Moser T, Wichmann C (2015): Unconventional molecular regulation of synaptic vesicle replenishment in cochlear inner hair cells. *J Cell Sci* 128, 638–644
- Wang Y, Sugita S, Südhof T (2000): The RIM/NIM family of neuronal C2 domain proteins. Interactions with Rab3 and a new class of Src homology 3 domain proteins. *J Biol Chem* 275, 20033–20044
- Wittig J Jr, Parsons T (2008): Synaptic ribbon enables temporal precision of hair cell afferent synapse by increasing the number of readily releasable vesicles: a modeling study. *J Neurophysiol* 100, 1724–1739
- Wong A, Jing Z, Rutherford M, Frank T, Strenzke N, Moser T (2013): Concurrent Maturation of Inner Hair Cell Synaptic Ca^{2+} Influx and Auditory Nerve Spontaneous Activity around Hearing Onset in Mice. *J Neurosci* 33, 10661–10666

Wu X, Cai Q, Shen Z, Chen X, Zeng M, Du S, Zhang M (2019): RIM and RIM-BP Form Presynaptic Active-Zone-like Condensates via Phase Separation. *Molecular Cell* 73, 971-984.e5

Yasunaga S, Grati M, Cohen-Salmon M, El-Amraoui A, Mustapha M, Salem N, El-Zir E, Loiselet J, Petit C (1999): A mutation in OTOF, encoding otoferlin, a FER-1-like protein, causes DFNB9, a nonsyndromic form of deafness. *Nat Genet* 21, 363–369

Danksagung

Besonders möchte ich Prof. Tobias Moser danken, der mich sowohl im Rahmen dieser Arbeit als auch darüber hinaus begleitet und intensiv unterstützt hat.

Großer Dank gilt auch Prof. Thomas Dresbach, der mich als Ko-Betreuer bei meiner Doktorarbeit unterstützt hat.

Des Weiteren danke ich meinen Kollegen aus dem Institut für Auditorische Neurowissenschaften und dem Innenohr Labor. Besonders hervorheben möchte ich dabei Dr. Jakob Neef für Ratschläge und technische Unterstützung, Dr. Christian Vogl und Dinah Burfeind für Hilfe bei der Durchführung der RNAscope[®] Experimente, Dr. Friederike Predoehl für die Durchführung der RT-PCR Experimente, Nadine Dietrich für die Durchführung der *in vivo* Experimente, Daniela Marschall für die Tierpflege und Christiane Senger Freitag and Sandra Gerke für die Genotypisierung der Mauslinie. Auch danke ich Prof. Christian Rosenmund, Dr. Katharina Grauel und Prof. Stephan Sigrist für die Bereitstellung der RIM-BP Mauslinie.

Publikationen

Krinner S, Predoehl F, Burfeind D, Vogl C, Moser T (2021): RIM-Binding Proteins Are Required for Normal Sound-Encoding at Afferent Inner Hair Cell Synapses. *Front Mol Neurosci* 14, 651935

Krinner S: Molecular physiology of synaptic sound encoding at the first auditory synapse. *Naturwissenschaftl. Diss. Göttingen* 2018

Krinner S, Butola T, Jung S, Wichmann C, Moser T (2017): RIM-Binding Protein 2 Promotes a Large Number of Cav1.3 Ca²⁺-Channels and Contributes to Fast Synaptic Vesicle Replenishment at Hair Cell Active Zones. *Front Cell Neurosci* 11, 334

Imig C, Min S, **Krinner S**, Arancillo M, Rosenmund C, Südhof T, Rhee J, Brose N, Cooper B (2014): The morphological and molecular nature of synaptic vesicle priming at presynaptic active zones. *Neuron* 84, 416–431

Weiler S, **Krinner S**, Wong A, Moser T, Pangršič T (2014): ATP Hydrolysis Is Critically Required for Function of Cav1.3 Channels in Cochlear Inner Hair Cells via Fueling Ca²⁺ Clearance. *J Neurosci* 34, 6843–6848