

Rotverschiebung der spektralen Empfindlichkeit der lichtsensitiven Ionenkanäle ChR2 und ReaChR durch enzymatische Vitamin-A₂-Produktion

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Johanna Pia Gerhards

aus Bielefeld

2025

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Philipp Sasse
2. Gutachter: Prof. Dr. Volker Busskamp

Tag der mündlichen Prüfung: 17.09.2025

Aus dem Institut für Physiologie I

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	4
1.	Deutsche Zusammenfassung	5
1.1	Einleitung	5
1.2	Material und Methoden	7
1.3	Ergebnisse	11
1.4	Diskussion	14
1.5	Zusammenfassung	20
1.6	Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	22
2.	Veröffentlichungen	27
3.	Erklärung zum Eigenanteil	28
4.	Danksagung	29
5.	Publikationen (PDF-Version)	30

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Varianzanalyse (<i>analysis of variance</i>)
ATP	Adenosintriphosphat
CAG	<i>chicken beta-actin gene</i>
ChR2	Channelrhodopsin-2
CMV	<i>Cytomegalovirus</i>
CYP	Cytochrom P 450
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
eGFP	grün fluoreszierendes Protein (<i>enhanced green fluorescent protein</i>)
EGTA	Ethylenbis(oxyethylenitrilo)tetraessigsäure (<i>ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>)
EYFP	gelb fluoreszierendes Protein (<i>enhanced yellow fluorescent protein</i>)
FCS	Fetales Kälberserum (<i>foetal calf serum</i>)
Fig.	<i>Figure</i> , die der entsprechenden Abbildung aus Gerhards et al. 2023 entspricht
HEK	humane embryonale Niere (<i>human embryonic kidney</i>)
HEPES	2- (4- (2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high-performance liquid chromatography</i>)
RDH	Retinoldehydrogenase
ReaChR	<i>red-activatable Channelrhodopsin</i>
S.E.M.	Standardfehler (<i>standard error of the mean</i>)

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

Optogenetik bezeichnet eine Forschungsmethode, bei der lichtempfindliche Proteine (Photorezeptoren) in spezifische Zellen oder Organe eingebracht werden, um mithilfe von Licht molekulare Prozesse zu untersuchen und zu steuern. Durch die optische Stimulation der lichtempfindlichen Proteine, die durch gezielte gentechnische Verfahren in die Zielzellen eingebracht werden, ermöglichen optogenetische Methoden eine zell-spezifische Manipulation mit enormer zeitlicher und räumlicher Präzision auch innerhalb von intaktem Gewebe (Deisseroth, 2011).

Eine Vielzahl optogenetischer Proteine mit unterschiedlichen Funktionen, wie Ionenkanäle, Pumpen oder Rezeptoren, wurde entwickelt und wird für verschiedenste Anwendungen und Forschungsbereiche genutzt (Deisseroth, 2015; Emiliani et al., 2022; Govorunova et al., 2022; Joshi et al., 2019). Ein sehr bekannter und häufig verwendeter Vertreter dieser optogenetischen Proteine ist Channelrhodopsin-2 (ChR2), ein aus Algen stammender Ionenkanal, der bei Beleuchtung öffnet und somit einen Photostrom erzeugt (Deisseroth und Hegemann, 2017). Der Lichtwellenlängenbereich, der eine Aktivierung der optogenetischen Proteine auslöst, kann als die spektrale Empfindlichkeit dargestellt werden und liegt bei ChR2 und vielen anderen optogenetischen Proteinen zwischen 470 und 490 nm (Deisseroth und Hegemann, 2017).

Für Anwendungen der Optogenetik in vivo ist jedoch eine Aktivierbarkeit der verwendeten Photorezeptoren mit rotem Licht (~600-700 nm) bzw. Licht im nahen Infrarotbereich (~700-900 nm) von großem Vorteil, da rötliches Licht, im Gegensatz zu blau-grünlichem Licht, Gewebe deutlich besser durchdringen kann und mit weniger Phototoxizität einhergeht (Bruegmann et al., 2016; Lehtinen et al., 2021; Weissleder, 2001). Vor diesem Hintergrund wurden in den letzten Jahrzehnten an einer Vielzahl an Channelrhodopsin-Varianten mit rotverschobener spektraler Empfindlichkeit geforscht. Jedoch haben viele der rotverschobenen Varianten im Hinblick auf die Expression, die Kinetik des Photostroms oder die Ionenselektivität weniger optimale Eigenschaften als ChR2 (Chen et al., 2018; Lin, 2011; Sineshchekov et al., 2012). Eine dieser rotverschobenen Varianten ist

ReaChR, dessen Aktivierungsmaximum zwischen 590 und 630 nm liegt und daher für die rotverschobene Optogenetik eine vielversprechende Alternative zu ChR2 darstellt (Lin et al., 2013).

Ein Photorezeptor besteht aus dem Proteinanteil, z. B. einem Opsin, und dem Chromophor, der in Säugetieren aus Vitamin A₁ entsteht. Die spektrale Empfindlichkeit eines Photorezeptors wird durch die Wechselwirkungen zwischen dem Chromophor und der Bindungsstelle des Opsins sowie der Struktur des Chromophors selbst bestimmt (Corbo, 2021). Durch bestimmte chemische Strukturen des Chromophors wie konjugierte Doppelbindungen entsteht ein delokalisiertes π -Elektronensystem, das Photonen spezifischer Wellenlängen absorbiert. Grundsätzlich gilt, dass je ausgedehnter das System der konjugierten Doppelbindungen ist, desto mehr π -Elektronen sind enthalten und desto länger ist die absorbierte Wellenlänge. Demnach verschiebt sich die spektrale Empfindlichkeit eines Photorezeptors in den rötlichen Lichtwellenlängenbereich, wenn der Chromophor auf Vitamin A₂ statt Vitamin A₁ basiert, da Vitamin A₂ (all-trans-3,4-Didehydroretinol) eine zusätzliche Doppelbindung im Vergleich zu Vitamin A₁ (all-trans-Retinol) enthält. Neben der Veränderung der Proteinstruktur ermöglicht daher die Substitution des Vitamin A₁ mit Vitamin A₂ eine alternative Strategie zur Rotverschiebung der spektralen Empfindlichkeit optogenetischer Rezeptoren (Shen et al., 2018; Sineshchekov et al., 2012). So haben Sineshchekov et al. (2012) gezeigt, dass das Hinzugeben von Vitamin A₂ zu mikrobiellen Opsinen wie ChR2 zu einer Rotverschiebung der spektralen Empfindlichkeit von etwa 30 bis 40 nm führt. Für Anwendungen in vivo ist das Hinzugeben von Vitamin A₂ z. B. über die Blutbahn jedoch keine praktikable Option, da das natürlicherweise im Serum von Menschen und Säugetieren vorkommende Vitamin A₁ aufgrund der ähnlichen Bindungsaffinität mit dem hinzugegebenen Vitamin A₂ um die Bindungsstelle im Photorezeptor konkurrieren würde (Sineshchekov et al., 2012).

In bestimmten aquatischen Wirbeltieren ermöglicht Vitamin A₂ ein erweitertes visuelles Spektrum im nahen Infrarotbereich, was als Anpassung an das rotverschobene Lichtspektrum im Süßwasser interpretiert wird (Enright et al., 2015). Enright et al. (2015) konnten das Enzym Cyp27c1 in den Sehpigmenten dieser Tiere als das verantwortliche Enzym für die Umwandlung von Vitamin A₁ in Vitamin A₂ identifizieren.

Ziel dieser Arbeit ist es, Cyp27c1 erstmalig als optogenetische Methode anzuwenden und zu zeigen, dass die Expression von Cyp27c1 durch die enzymatische Umwandlung von Vitamin A₁ zu Vitamin A₂ zu einer Rotverschiebung der spektralen Empfindlichkeit optogenetischer Rezeptoren wie ChR2 und ReaChR führt.

1.2 Material und Methoden

In dieser Arbeit habe ich den Effekt des durch Cyp27c1 produzierten Vitamin A₂ auf die spektrale Empfindlichkeit von ChR2 und ReaChR untersucht. Dazu habe ich HEK293-Zellen mit stabiler Expression von ChR2-EYFP oder ReaChR-Cerulean mit Vitamin A₁ oder Vitamin A₂ inkubiert und mit Patch-Clamp-Technik die Photoströme bei verschiedenen Wellenlängen gemessen und die spektrale Empfindlichkeit analysiert. Mithilfe eines CAG-GFP-Cyp27c1-Vektors wurde eine HEK293-Zelllinie mit stabiler Cyp27c1-Expression hergestellt. In dieser wurde durch transiente Transfektion die Expression von ChR2-EYFP oder ReaChR-Cerulean herbeigeführt, sodass diese Zellen dann sowohl Cyp27c1 als auch ChR2 oder ReaChR exprimierten. Wildtyp-HEK293 Zellen wurden analog dazu mit ChR2-EYFP oder ReaChR-Cerulean transfiziert und dienten als Kontrollen ohne Cyp27c1.

Mithilfe einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) wurde Vitamin A₁ und A₂ für verschiedene Konditionen quantifiziert und mit einer Antikörperfärbung die Lokalisierung von Cyp27c1 gezeigt. Schließlich habe ich die Photoströme bei verschiedenen Wellenlängen der sowohl Cyp27c1 als auch ChR2 oder ReaChR exprimierenden Zellen mit Patch-Clamp-Technik gemessen und die spektrale Empfindlichkeit analysiert.

Im Folgenden sind die einzelnen Methoden im Detail erläutert.

1.2.1 Herstellung des CAG-CYP27c1-eGFP-Vektors

Der AAV_pVDM2_Dr_Cyp-Vektor (Enright et al., 2015), in dem Cyp27c1 und eGFP über ein selbstspaltendes T2A-Peptid verbunden sind, wurde mit den Restriktionsenzymen BlnI und BsrGI geschnitten. Das resultierende 3009 bp-Fragment wurde in das 5895 bp-Fragment des pCAG_ChR2_eYFP-Vektors (Bruegmann et al., 2010) subkloniert, der zuvor mit denselben Enzymen geschnitten wurde und einen Neomycin-Selektionsmarker

enthält. Der resultierende pCAG_Cyp27c1_eGFP-Vektor wurde mit Restriktionsenzymanalyse und Sequenzierung verifiziert. Für die Expression von ReaChR-Cerulean wurde der peGFP-N1_ReaChR_mCerulean-Vektor (erhalten von J. Vierock) mit einem CMV-Promotor verwendet.

1.2.2 HEK293-Zellkultur und Transfektion

Als Grundlage für die HEK293-Zellkultur (AD-293, ATTC) wurde Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Life Technologies) verwendet. Zusätzlich wurde 10%-iges FCS (Capricorn Scientific), 0,1 mM nicht-essentielle Aminosäuren, 100 U/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin und 0,1 mM β -Mercaptoethanol (allesamt Thermofisher) hinzugegeben. Jeweils etwa 20.000 HEK293-Zellen wurden auf mit Fibronektin beschichteten 22-mm²-Deckgläsern plattiert und 24 h lang inkubiert. Das CAG-Cyp27c1-eGFP Plasmid wurde mit PvuI linearisiert, anschließend erfolgte die Transfektion bei 60-80%iger Konfluenz mit Fugene HD (Promega) unter Verwendung von 2-3 μ g DNA pro Deckglas. Die Zelllinien wurden mit 600 μ g/ml Geneticin G418 (Thermofisher) selektiert, sodass eine Zelllinie mit stabiler Cyp27c1-Expression entstand. Mithilfe einer transienten Transfektion dieser Zelllinie entstanden so Zellen, die sowohl Cyp27c1 als auch ChR2 bzw. ReaChR exprimierten. Für die Inkubation wurde das speziell angefertigte, serumfreie Panserin293-Medium (Pan Biotech) mit einer festgelegten Konzentration von 0,4 μ M Vitamin A₁ als Retinol-Acetat verwendet, da das standardmäßig in der Zellkultur verwendete Zellkulturmedium auf Basis von FCS eine undefinierte Konzentration von Vitamin-A-Derivaten enthält. Nach 48-72 h Inkubation im Panserin293-Medium wurden die Zellen für die Experimente verwendet. Für einige Experimente wurde mindestens 24 h vorher die angegebene Konzentration Vitamin A₁ (all-trans-Retinol, R7632, Sigma) oder Vitamin A₂ (all-trans-3,4-Didehydroretinol, sc-209587, Santa Cruz Biotechnology) hinzugegeben.

1.2.3 Messung und Analyse der Photoströme

Die Patch-Clamp-Experimente wurden mit einem EPC10-Verstärker (Heka) bei einer Aufzeichnungsfrequenz von 10 kHz an einem Nikon Ti2-Mikroskop mit 20-fachem Objektiv (S Fluor DIC M/N2 Nikon) bei 35 ± 2 °C mit einer externen Lösung bestehend aus 140 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 10 mM Glucose, 10 mM HEPES (pH

7,4, NaOH) und einer internen Lösung bestehend aus 50 mM KCl, 80 mM K-Aspartat, 1 mM MgCl_2 , 3 mM MgATP, 10 mM EGTA, 10 mM HEPES (pH 7,2, KOH) durchgeführt. Die Pipetten wurden mit einem P-1000-Puller (Sutter Instrument) und einem Spitzenwiderstand von 4-6 M Ω aus Borosilikatglas (BF 150-86-10, Scientific Products) gezogen. Mithilfe eines Monochromators mit Xenonbogenlampe (Optoscan, Cairn), gesteuert durch den Patch-Clamp-Verstärker und einen selbstprogrammierten Mikrocontroller (Arduino) wurde Licht mit einer Bandbreite von 30 nm erzeugt. Die Lichtintensitäten wurden auf der Ebene des Objektglases mit einem Powermeter (PM100A mit S170C Microscope Slide Power Sensor, Thorlabs) kalibriert und sind in Tabelle 1 angegeben.

Mithilfe von optischen Filtern für die spezifischen Emissionswellenlängen konnten Cerulean, eGFP und eYFP in den zu untersuchenden Zellen unterschieden werden. Zur Analyse der spektralen Empfindlichkeit wurden die Zellen auf einem Haltepotential von -40 mV gehalten und alle 6 s ein 500 ms langer Lichtpuls mit in 10 nm Schritten ansteigenden Wellenlängen abgegeben und jeweils der Photostrom gemessen. Die spektrale Empfindlichkeit wurde für ChR2 im Wellenlängenbereich von 480 nm bis 600 nm und für ReaChR von 590 nm bis 700 nm untersucht. Der Plateau-Photostrom wurde als der gemessene Photostrom am Ende des Lichtpulses (300-495 ms nach Beginn der Lichtapplikation) abzüglich des Baseline-Photostroms (250-475 ms nach Ende der Beleuchtung) definiert. Die so errechneten Plateau-Photoströme wurden auf die Zellkapazität normiert und für die weitere Analyse verwendet. Auf eine Normierung auf die Lichtintensität wurde verzichtet, da gesättigte Photoströme gemessen wurden (siehe Diskussion). Die Photoströme wurden entweder als absolute Ströme oder für den Vergleich der spektralen Empfindlichkeit als relative Ströme normiert auf den maximalen Strom der jeweiligen Zelle dargestellt.

1.2.4 Immunhistochemie

Die Zellen wurden mit 4 % Paraformaldehyd fixiert und für 2 h mit Rabbit-anti-Cyp27c1 (Enright et al., 2015); 1:300) oder Mouse-anti-F1- β der mitochondrialen ATP-Synthase (erhalten von W. Voos, 1:80) inkubiert. Sekundäre Goat-anti-rabbit-Antikörper (Alexa Fluor 647, Thermo Fisher, 1:400) oder Goat-anti-mouse-Antikörper (Alexa Fluor 555, Thermo Fisher, 1:400) wurden für 1 h bei Raumtemperatur appliziert. Die Aufnahmen der

Immunfärbungen wurden mit einem konfokalen Zeiss LSM- oder einem Nikon Eclipse Ti2-Mikroskop erstellt.

1.2.5 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

HEK293-Zellen, die mit Vitamin A₁ (all-trans-Retinol) inkubiert wurden, wurden abgelöst, zentrifugiert, eingefroren und bei -80°C gelagert. Anschließend wurden die Proben aufgetaut und homogenisiert. Bei einem kleinen Teil der so gewonnenen Probe wurde der Proteingehalt bestimmt, der für die Normalisierung verwendet wurde. Für die HPLC-Analyse wurden die Retinaldehyde mit Hydroxylamin (Sigma, 255580) derivatisiert und nach Volkov et al. (2020) analysiert. Retinoide wurden durch den Vergleich mit Retinol und 3,4-Didehydroretinol-Standards sowie mit veröffentlichten HPLC-Protokollen bzw. Ergebniskurven identifiziert (Babino et al., 2015; Kane und Napoli, 2010; Morshedien et al., 2017). Für die Quantifizierung wurden für die A₁-Retinoide (all-trans-Retinol und 13-cis-Retinol) Standardkurven mit Retinol (R7632, Sigma) und für die A₂-Retinoide (all-trans-3,4-Didehydroretinol und 13-cis-3,4-Didehydroretinol) mit 3,4-Didehydroretinol (sc-209587, Santa Cruz Biotechnology) erstellt. Grundlage für die Berechnungen waren veröffentlichte Extinktionskoeffizienten (Barua und Furr, 1998). Da die HPLC-Analyse nach Inkubation mit 3,5 und 35 µM Vitamin A₁ sehr ähnliche Ergebnisse zeigte, wurden diese beiden Konditionen in der statistischen Auswertung der HPLC-Analyse zusammengefasst.

1.2.6 Statistische Auswertung

Die Daten wurden offline mit den Programmen Fitmaster (Heka), Graph Pad Prism 6 (GraphPad) und Origin (OriginLab) ausgewertet und als Mittelwert ± SEM angegeben. Die statistische Analyse wurde mit einem ungepaarten t-Test oder einer einseitigen Varianzanalyse (ANOVA) mit Tukey-Test durchgeführt. Ein p-Wert ≤ 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet.

1.3 Ergebnisse

1.3.1 Inkubation von ChR2 mit Vitamin A₂

Um den Effekt von Vitamin A₂ im Vergleich zu Vitamin A₁ auf die spektrale Empfindlichkeit von ChR2 zu untersuchen, wurden HEK293-Zellen mit stabiler Expression von ChR2-EYFP (Fig. 1a) mit Vitamin A₁ (25 µM) oder Vitamin A₂ (25 µM) inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit Licht verschiedener Wellenlängen zwischen 480 nm und 600 nm beleuchtet und der jeweilige Photostrom bei einer bestimmten Wellenlänge mittels Patch-Clamp-Technik gemessen, beispielhaft dargestellt für die Wellenlänge 480 nm in Fig. 1b. Die gemessenen Photoströme wurden gegen die applizierten Lichtwellenlängen aufgetragen und zeigen so die spektrale Empfindlichkeit von ChR2.

Für die Vitamin-A-Inkubationen wurde das speziell angefertigte, serumfreie Panserin293-Medium mit einer festgelegten Konzentration von 0,4 µM Vitamin A₁ verwendet, da das standardmäßig in der Zellkultur verwendete Zellkulturmedium auf Basis von FCS eine undefinierte Konzentration von Vitamin-A-Derivaten enthält. Um die in-vivo-Situation zu simulieren, in der Vitamin A hauptsächlich als Retinol, also in der Alkoholform, vorliegt, wurden für die Experimente Vitamin A₁ und Vitamin A₂ ebenfalls als Retinol hinzugegeben. Da Vitamin A innerhalb von Channelrhodopsin jedoch als Retinal, also in der Aldehydform, gebunden wird, kann davon ausgegangen werden, dass endogene Dehydrogenasen das hinzugefügte Retinol in Retinal umwandeln (siehe Diskussion).

Im Vergleich zur Inkubation mit Vitamin A₁ führte Vitamin A₂ zu einer Verschiebung der spektralen Empfindlichkeit von ChR2 in rötlichere Lichtwellenlängenbereiche (Fig. 1c, Pfeil) und somit zu größeren ChR2-Strömen zwischen 525 und 600 nm (Fig. 1d). Die Wellenlänge, bei der halbmaximale Ströme erzielt werden ($\lambda_{50\%}$), war nach der Inkubation mit Vitamin A₂ um 6,8 nm rotverschoben. Bei 550 nm, wo die Verschiebung der spektralen Empfindlichkeit deutlich zu sehen ist, erreichten die mit Vitamin A₂ inkubierten Zellen $24,5 \pm 0,5$ % des maximalen Photostroms, während die mit Vitamin A₁ inkubierten Zellen nur $19,2 \pm 1,0$ % erreichten (Fig. 1e). In den absoluten Photoströmen bei 550 nm konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Fig. 1f).

1.3.2 Inkubation von ReaChR mit Vitamin A₂

Im nächsten Schritt habe ich den Effekt von Vitamin A₂ auf ReaChR, einer ChR2-Variante mit rotverschobener spektraler Empfindlichkeit, untersucht. In HEK293-Zellen mit stabiler Expression von ReaChR-Cerulean (Fig. 2a,b) zeigte sich eine Rotverschiebung der spektralen Empfindlichkeit nach Inkubation mit Vitamin A₂ im Vergleich zu Vitamin A₁ (Fig. 2c, Pfeil). In Bezug auf die $\lambda_{50\%}$ bedeutet dies eine Verschiebung um 12,4 nm (Fig. 2c). ReaChR-exprimierende Zellen, die mit Vitamin A₂ inkubiert wurden, zeigten etwa 2,5-fach größere Photoströme im rötlichen Lichtspektrum (~660 nm) nach Inkubation mit Vitamin A₂ als mit Vitamin A₁ (Fig. 2d). ReaChR-Photoströme bei 650 nm erreichten nach Inkubation mit Vitamin A₁ $11,0 \pm 0,7\%$ des maximalen Stroms, während hingegen $25,7 \pm 1,4\%$ des maximalen Photostroms nach Vitamin-A₂-Inkubation gemessen wurde (Fig. 2e). In den absoluten Photoströmen bei 650 nm konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Fig. 2f).

1.3.3 Umwandlung von Vitamin A₁ in Vitamin A₂ durch Cyp27c1

Eine Hürde für potentielle Anwendungen von Vitamin A₂ in der in-vivo-Optogenetik stellt das im Serum von Säugetieren und damit auch dem Menschen vorliegende Vitamin A₁ dar (Enright et al., 2015; Kramlinger et al., 2016; Michaëlsson et al., 2003; Soares-Mota et al., 2015; Xie et al., 2019), da es mit Vitamin A₂ um die Bindungsstelle im Photorezeptor konkurriert (Sineshchekov et al., 2012). Um sich das im Serum vorhandene Vitamin A₁ zunutze zu machen, verwendete ich in dieser Arbeit das Enzym Cyp27c1, das Vitamin A₁ in Vitamin A₂ umwandelt (Enright et al., 2015). Mit dem CAG-GFP-Cyp27c1-Vektor (Fig. 3a) wurde eine HEK293-Zelllinie mit stabiler Expression von Cyp27c1 und GFP hergestellt (Fig. 3b). Der Vergleich von GFP-Fluoreszenzsignalen (Fig. 3c, grün), Anti-Cyp27c1 (Fig. 3c, rot) sowie einer Mitochondrienfärbung (Fig. 3c, weiß) in Cyp27c1-exprimierenden Zellen deutete auf eine mitochondriale Lokalisierung von Cyp27c1 hin, wie sie für Cyp27c1 als Mitglied der CYP-Enzymgruppe auch zu erwarten ist.

Um die Umwandlung von Vitamin A₁ in Vitamin A₂ durch Cyp27c1 in HEK293-Zellen nachzuweisen, wurde eine HPLC-Analyse von HEK293-Zellen mit und ohne Cyp27c1-Expression durchgeführt. Da die HPLC-Analyse nicht sensitiv genug war, um Vitamin A in HEK293-Zellen nachzuweisen, die zuvor in Panzerin293-Medium kultiviert wurden,

wurde 24 h vor Probengewinnung 3,5 oder 35 μM Vitamin A₁ in Form von all-trans-Retinol zu den Zellen hinzugegeben. Da diese beiden Konditionen sehr ähnliche Ergebnisse aufwiesen, wurden sie für die statistische Auswertung der HPLC-Analyse zusammengefasst. Die HPLC-Analyse zeigte Vitamin A₁ und Vitamin A₂ Formen in Zellen mit Cyp27c1-Expression, jedoch ausschließlich Vitamin A₁-Formen in den Kontrollzellen ohne Cyp27c1-Expression (Fig. 3d-f).

1.3.4 Verschiebung der spektralen Empfindlichkeit von ChR2 durch Cyp27c1

Um den Effekt von Cyp27c1 und des dadurch produzierten Vitamins A₂ auf die spektrale Empfindlichkeit des am häufigsten verwendeten optogenetischen Rezeptors ChR2 zu analysieren, wurde ChR2-EYFP transient in einer stabilen Cyp27c1-Zelllinie (Fig. 4a) oder in einer Wildtyp HEK293-Zelllinie als Kontrolle exprimiert. Die Analyse der Photoströme zeigte, dass Cyp27c1-Expression zu einer Rotverschiebung der spektralen Empfindlichkeit von ChR2 führt (Fig. 4b, Pfeil), die sogar ausgeprägter war als nach Inkubation mit Vitamin A₂ (Fig. 4b,d). Interessanterweise wurde diese Rotverschiebung der spektralen Empfindlichkeit durch Hinzugabe von 5 μM Vitamin A₁ zum Kulturmedium wieder aufgehoben (Fig. 4b,d). Photoströme in Cyp27c1-exprimierenden HEK293-Zellen waren im Wellenlängenbereich von 550 bis 600 nm bis zu dreimal größer als in den Kontrollzellen ohne Cyp27c1-Expression (Fig. 4c), ebenso wurde $\lambda_{50\%}$ durch die Expression von Cyp27c1 um 10,5 nm in den rötlicheren Bereich verschoben (Fig. 4d). So erreichten beispielsweise Zellen ohne Cyp27c1-Expression bei 550 nm nur $15,2 \pm 0,5$ % des maximalen Stroms, während Cyp27c1-exprimierende Zellen $30,4 \pm 1,1$ % des maximalen Stroms zeigten (Fig. 4e). Auch die absoluten Photoströme bei 550 nm fielen mit Cyp27c1-Expression mit $2,0 \pm 0,2$ pA/pF im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle mit $1,0 \pm 0,1$ pA/pF signifikant größer aus (Fig. 4f).

1.3.5 Verschiebung der spektralen Empfindlichkeit von ReaChR durch Cyp27c1

Die Kombination von Cyp27c1 mit ChR2-Varianten mit rotverschobenem Aktivierungsspektrum könnte ein vielversprechender Ansatz sein, um eine spektrale Empfindlichkeit

optogenetischer Rezeptoren in weiter rötlichen Lichtwellenlängenbereichen zu ermöglichen. Daher habe ich den Effekt von Cyp27c1 auf die rotverschobene ChR2-Variante ReaChR untersucht. Cyp27c1-exprimierende HEK293-Zellen mit transienter Expression von ReaChR (Fig. 5a), zeigten im Vergleich zur Kontrolle ohne Cyp27c1-Expression eine signifikante Rotverschiebung der spektralen Empfindlichkeit (Fig. 5b, Pfeil, Fig. 5d). Nach Hinzugeben von 5 μ M Vitamin A₁ war dieser Effekt wieder aufgehoben (Fig. 5b,d). Die Photoströme Cyp27c1-exprimierender Zellen waren bei Wellenlängen zwischen 630 und 690 nm bis zu viermal größer als in Zellen ohne Cyp27c1-Expression (Fig. 5c). Kontrollzellen erreichten bei den beispielhaft dargestellten 650 nm nur $9,9 \pm 1,3$ % des maximalen Stroms, während die Cyp27c1-exprimierenden Zellen $29,3 \pm 4,2$ % des maximalen Stroms aufwiesen (Fig. 5e). Ebenso stiegen durch die Cyp27c1-Expression die absoluten Photoströme von $0,3 \pm 0,1$ pA/pF auf $2,3 \pm 0,3$ pA/pF (Fig. 5f). Aus einer $\lambda_{50\%}$ von $635,0 \pm 3,1$ nm für Cyp27c1-exprimierende Zellen und $620,7 \pm 1,4$ nm für Kontrollzellen (Fig. 5d) ergibt sich eine Cyp27c1-induzierte Rotverschiebung der $\lambda_{50\%}$ um 14,3 nm.

1.4 Diskussion

Cyp27c1 konnte von Enright et al. (2015) als das verantwortliche Enzym für die Umwandlung von Vitamin A₁ in Vitamin A₂ in den Sehpigmenten bestimmter aquatischer Wirbeltiere identifiziert werden. Dadurch ist das visuelle Spektrum dieser Fische im nahen Infrarotbereich erweitert und an das Lichtspektrum im Süßwasser angepasst. In dieser Arbeit konnte ich Cyp27c1 erstmalig als optogenetische Methode anwenden und zeigen, dass die enzymatische Umwandlung von Vitamin A₁ zu Vitamin A₂ durch Cyp27c1 zu einer Rotverschiebung der spektralen Empfindlichkeit der lichtsensitiven Rezeptoren ChR2 und ReaChR führt.

Für Anwendungen der Optogenetik in vivo ist eine Aktivierbarkeit der verwendeten Photorezeptoren mit rötlichem Licht bzw. Licht im nahen Infrarotbereich (~650-900 nm) von großem Vorteil, da rotes Licht, im Gegensatz zu blau-grünlichem Licht, Gewebe deutlich besser durchdringen kann und mit weniger Phototoxizität einhergeht (Bruegmann et al.,

2016; Lehtinen et al., 2021; Weissleder, 2001). Die spektrale Empfindlichkeit der bekanntesten und am häufigsten verwendeten optogenetischen Rezeptoren liegt jedoch im blaugrünen Wellenlängenbereich, darunter auch ChR2 mit seinem Aktivierungsmaximum zwischen 470 und 490 nm (Deisseroth und Hegemann, 2017). Vor diesem Hintergrund wurden in den letzten Jahrzehnten vielzählige Channelrhodopsin-Varianten mit rotverschobener spektraler Empfindlichkeit entwickelt, wie auch das in dieser Arbeit verwendete ReaChR (Lin et al., 2013). Viele dieser entwickelten Varianten haben jedoch im Hinblick auf Expression, Kinetik oder Ionenselektivität weniger optimale Eigenschaften als das klassische ChR2 (Chen et al., 2018; Lin, 2011; Sineshchekov et al., 2012).

Auch die Verwendung von Vitamin A₂ statt Vitamin A₁ könnte mit veränderten Eigenschaften des Photorezeptors einhergehen. So diskutierte beispielweise Corbo (2021) eine reduzierte Lichtempfindlichkeit bei der Verwendung von Vitamin A₂ statt Vitamin A₁, die sich wahrscheinlich auch in den Ergebnissen dieser Arbeit widerspiegelt: Die Tatsache, dass sich kein signifikanter Unterschied in den absoluten Photoströmen zwischen Inkubation mit Vitamin A₁ oder A₂ (Fig. 1f, 2f) zeigte, ist möglicherweise auf größere maximale Photoströme bei der Verwendung von Vitamin A₁ zurückzuführen (Daten nicht gezeigt) und kann somit als Hinweis auf eine reduzierte Lichtempfindlichkeit durch Vitamin A₂ gedeutet werden. Ob und in welchem Ausmaß eine reduzierte Lichtempfindlichkeit für optogenetische Anwendungen relevant ist, lässt sich aktuell schwer abschätzen. Allerdings kamen Karathanos et al. (2016) zu dem Ergebnis, dass die spektrale Empfindlichkeit, auch im Vergleich zur Lichtempfindlichkeit, der wichtigste Faktor für eine erfolgreiche optogenetische Defibrillation im menschlichen Herzen ist. Abgesehen von einer möglicherweise reduzierten Lichtempfindlichkeit gibt es bisher keine Hinweise darauf, dass durch die Inkubation mit Vitamin A₂ anstatt Vitamin A₁ grundlegende Funktionen des Rezeptorproteins verändert werden (Sineshchekov et al., 2012). Die enzymatische Umwandlung von Vitamin A₁ zu Vitamin A₂ durch Cyp27c1 stellt somit eine vielversprechende Strategie zur Rotverschiebung der spektralen Empfindlichkeit optogenetischer Rezeptoren dar.

Im Gegensatz zu Sineshchekov et al. (2012), die eine Rotverschiebung von λ_{50} um ~30 nm für verschiedene Channelrhodopsin-Varianten in HEK-293 Zellen nach Vitamin-A₂-

Inkubation beschrieben, zeigten die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit identischer Konzentration von Vitamin A₂ nur eine Rotverschiebung $\lambda_{50\%}$ um 6,8 nm für ChR2 (Fig. 1c, Fig. 4d) und 12,4 nm für ReaChR (Fig. 2c, Fig. 5d). Allerdings analysierten Sineshchekov et al. (2012) die nach einzelnen Lichtimpulsen vorkommenden Peak-Photoströme, während in dieser Arbeit bewusst die Wirkung von Cyp27c1 auf Plateau-Photoströme bei konstanter Lichtapplikation untersucht wurde. Denn für viele optogenetische Anwendungen, darunter die optogenetische Defibrillation (Bruegmann et al., 2016), ist eine konstante Depolarisation erforderlich und damit sind nur Plateau-Ströme relevant.

Ein weiterer Erklärungsansatz für den unterschiedlich groß ausgeprägten rotverschiebenden Effekt der Vitamin-A₂-Inkubation im Vergleich zu den Ergebnissen von Sineshchekov et al. (2012) liegt in der Verwendung von Vitamin A in der Alkohol- oder Aldehydform. Anders als Sineshchekov et al. (2012), die für ihre Experimente die Aldehydformen von Vitamin A₁ (all-trans-Retinal) und Vitamin A₂ (all-trans-3,4-Didehydroretinal, nicht kommerziell erhältlich) verwendeten, wurden in dieser Arbeit die Alkoholformen (all-trans-Retinol und all-trans-3,4-Didehydroretinol) verwendet. Grund hierfür ist, dass Vitamin A im menschlichen Serum als all-trans-Retinol vorliegt (Enright et al., 2015; Michaëlsson et al., 2003; Soares-Mota et al., 2015; Xie et al., 2019) und erst im Auge durch Enzyme des Sehzyklus in Retinal umgewandelt wird (Kiser et al., 2014). Somit lassen sich die gezeigten Ergebnisse mit Retinol besser auf die Situation in vivo übertragen. Außerdem zeigten Enright et al. (2015), dass die Umwandlungseffizienz von Cyp27c1 für Retinolformen höher ist als für Retinalformen.

Mikrobielle Opsine wie ChR2 und ReaChR binden allerdings Retinal- und nicht Retinolformen als Chromophor (Kandori, 2020). Das Vorhandensein bzw. der Einbau des Retinalmoleküls in das Opsin ist damit Voraussetzung für das Auftreten von Photoströmen. In den durchgeführten Experimenten konnten große ChR2- und ReaChR-Photoströme in HEK293-Zellen im Panzerin293-Medium gemessen werden, das Vitamin A in Form von Retinol enthält. Dies belegt die Umwandlung von Retinol in Retinal durch endogene Dehydrogenasen (Kiser et al., 2014) wie z. B. die Retinol-Dehydrogenase 14 (RDH14), die in HEK293-Zellen stark exprimiert wird (Rouillard et al., 2016). Eine HPLC-

Analyse von ChR2-exprimierenden HEK293-Zellen im Panzerin293-Medium konnte jedoch auch nach Zugabe von Retinol keinen Nachweis von Retinal erbringen (Daten nicht gezeigt). Die Photoströme beweisen jedoch, dass die wahrscheinlich durch die RDH entstandene, vermutlich unterhalb der HPLC-Nachweisgrenze liegende Menge Retinal für funktionierende Photorezeptoren ausreicht. Dies scheint plausibel vor dem Hintergrund, dass das Retinalmolekül während des Photozyklus von mikrobiellen Opsinen wie ChR2, im Gegensatz zu den menschlichen Opsinen im Auge, nicht dissoziiert (Kandori, 2020).

Interessanterweise konnten Sineshchekov et al. (2012) zeigen, dass das Ausmaß der Rotverschiebung der spektralen Empfindlichkeit mit dem Verhältnis von Vitamin A₂ und A₁ im Medium korreliert. Dies lässt auf eine Konkurrenz beider Vitamine um die Bindungsstelle des Opsins mit ähnlichen Bindungsaffinitäten schließen. Die Hypothese einer kompetitiven Konkurrenz von Vitamin A₁ und A₂ wird dadurch gestützt, dass die Cyp27c1-induzierte Rotverschiebung der spektralen Empfindlichkeit der optogenetischen Rezeptoren durch eine Erhöhung der Vitamin-A₁-Konzentration im Medium rückgängig gemacht wurde (Fig. 4b, d-f und Fig. 5b, d-f). Vor diesem Hintergrund wäre das Hinzugeben von Vitamin A₂ für optogenetische Anwendungen in vivo äußerst ineffizient, da es mit dem im Serum und Gewebe von Säugetieren vorliegenden Vitamin A₁ (Enright et al., 2015; Michaëlsson et al., 2003; Soares-Mota et al., 2015; Xie et al., 2019) konkurrieren würde. Dies würde sehr hohe Konzentrationen von Vitamin A₂ erfordern, was unbekannte systemische Auswirkungen auf den Organismus haben könnte. Eine erhöhte Vitamin-A₂-Konzentration wurde beispielsweise in Tumoren wie Keratoakanthomen und Plattenepithelkarzinomen gefunden (Vahlquist et al., 1996), ein kausaler Zusammenhang ist jedoch unklar. Weiterhin war die Rotverschiebung von $\lambda_{50\%}$ durch Cyp27c1 (für ChR2 10,5 nm und für ReaChR: 14,3 nm) leicht größer als durch Inkubation mit Vitamin A₂ (für ChR2 6,8 nm und für ReaChR 12,4 nm). Dies könnte durch die relativ hohe Konzentration des entstandenen Vitamin A₂ intrazellulär bzw. nahe der Bindungsstelle des Chromophors am Opsin zum Zeitpunkt Proteinentstehung erklärt werden. Die intrazelluläre Umwandlung des im Serum vorhandenen Vitamin A₁ zu A₂ durch Cyp27c1 stellt daher eine effizientere Methode zur Rotverschiebung der spektralen Empfindlichkeit als die Inkubation mit Vitamin A₂ dar.

Für eine potentielle Anwendung von Cyp27c1 in vivo stellt sich die Frage, ob Cyp27c1 das im Serum vorliegende Vitamin A₁ in ausreichendem Maße in Vitamin A₂ umwandeln kann. Die Experimente mit Cyp27c1 haben gezeigt, dass bei einer Vitamin-A₁-Konzentration von 0,4 µM im Panzerin293-Medium ausreichend Vitamin A₂ entsteht, um die spektrale Empfindlichkeit von ChR2 oder ReaChR in den rötlicheren Bereich zu verschieben. Generell wird die katalytische Effizienz von Cyp27c1 als eine der höchsten innerhalb der Cytochrom-P450-Familie beschrieben (Enright et al., 2015); die maximale katalytische Effizienz liegt bei einer Vitamin-A₁-Konzentration zwischen 0,1 und 2 µM. Da die Vitamin-A₁-Konzentration im menschlichen Blut mit 0,5-1,5 µM (Michaëlsson et al., 2003; Soares-Mota et al., 2015; Xie et al., 2019) innerhalb dieses Bereichs liegt, erscheint plausibel, dass Cyp27c1 auch bei physiologischen Vitamin-A₁-Konzentrationen in der Lage ist, ausreichend Vitamin A₂ zu produzieren, um eine Rotverschiebung der spektralen Empfindlichkeit optogenetischer Rezeptoren zu erzielen. Ob Cyp27c1 tatsächlich auch in vivo die spektrale Empfindlichkeit optogenetischer Rezeptoren verschiebt, gilt es im Rahmen zukünftiger Forschung zu überprüfen.

Für eine zukünftige in-vivo-Anwendung von Cyp27c1 sind auch Untersuchungen zu systemischen Nebenwirkungen der Cyp27c1-Expression notwendig. Die Tatsache, dass Cyp27c1-Orthologe in den meisten Säugetiergenomen sowie auch dem menschlichen Genom gefunden wurden (Enright et al., 2015), macht eine Toleranz des Immunsystems gegenüber Cyp27c1 wahrscheinlich. Johnson et al. (2017) berichteten außerdem über eine Lokalisierung von Cyp27c1 in der Haut, wobei die Funktion in diesem Kontext bisher unklar ist.

Der rotverschiebende Effekt von Vitamin A₂ wurde auch für verschiedene andere optogenetische Rezeptoren neben ChR2 und ReaChR2 nachgewiesen (Shen et al., 2018; Sineshchekov et al., 2012), was das breite mögliche Anwendungsgebiet von Cyp27c1 in der Optogenetik verdeutlicht. Corbo (2021) nimmt an, dass je größer die Wellenlänge ist, bei der ein Photorezeptor maximale Ströme erreicht (λ_{max}), desto größer sollte auch die Rotverschiebung der spektralen Empfindlichkeit bei Verwendung von Vitamin A₂ sein. Dieser Zusammenhang spiegelt sich auch in den Ergebnissen dieser Arbeit wider: die Rotverschiebung von $\lambda_{50\%}$ durch die Vitamin-A₂-Inkubation oder Cyp27c1-Expression ist

mit 12,4 nm oder 14,3 nm für ReaChR ($\lambda_{\max}$ ~590–630 nm; (Lin et al., 2013)) stärker ausgeprägt als mit 6,8 nm oder 10,8 nm für ChR2 ($\lambda_{\max}$ ~470–490 nm; (Deisseroth und Hegemann, 2017)). Die Kombination von Cyp27c1 auch mit anderen optogenetischen Rezeptoren, insbesondere solchen mit spektraler Empfindlichkeit im rötlichen Lichtwellenlängenbereich, z. B. Chrimson (Klapoetke et al., 2014), bietet eine spannende Perspektive für zukünftige Forschung und potentielle therapeutische Anwendungen.

Mögliche therapeutische Anwendungen der Optogenetik sind, unter anderen, das Unterbrechen ventrikulärer Tachykardien (Bruegmann et al., 2016), die Anfallskontrolle bei Epilepsie (Krook-Magnuson et al., 2013) oder die Wiederherstellung des Sehvermögens bei Patienten mit Retinopathia pigmentosa (Sahel et al., 2021). Diese Anwendungen würden von optogenetischen Rezeptoren mit einer spektralen Empfindlichkeit im rötlichen Wellenlängenbereich profitieren, da dies eine Aktivierung auch in tieferen Gewebeschichten ermöglichen könnte. Die Kombination von Cyp27c1 und ReaChR ermöglichte halbmaximale Photoströme bei 635 nm und selbst bei 650 nm noch ~30% der maximalen Ströme und könnte somit im optimalen Wellenlängenbereich für die Gewebepenetration von 650–900 nm (Weissleder, 2001) eingesetzt werden.

Zusammengefasst ist die enzymatische Umwandlung von Vitamin A₁ zu Vitamin A₂ durch Cyp27c1 eine neue und vielversprechende Strategie zur Rotverschiebung der spektralen Empfindlichkeit optogenetischer Rezeptoren.

1.5 Zusammenfassung

Optogenetik bezeichnet eine Forschungsmethode, bei der lichtempfindliche Rezeptoren (Photorezeptoren) in spezifische Zellen oder Organe eingebracht werden, um mithilfe von Licht und damit verbundener zeitlicher und räumlicher Präzision molekulare Prozesse zu untersuchen und zu steuern. Eine Vielzahl optogenetischer Proteine mit unterschiedlichen Funktionen, wie Ionenkanäle, Pumpen und Rezeptoren, wurde entwickelt und wird in verschiedensten Forschungsbereichen genutzt. Der Lichtwellenlängenbereich, der eine Aktivierung der optogenetischen Proteine auslöst, liegt oft im blau-grünen Wellenlängenbereich. Für die Anwendung optogenetischer Methoden *in vivo* ist jedoch eine Aktivierbarkeit der Rezeptoren mit rötlichem Licht von großer Bedeutung, da rotes Licht, im Gegensatz zu blau-grünlichem Licht, Gewebe deutlich besser durchdringen kann und mit weniger Phototoxizität einhergeht. Die spektrale Empfindlichkeit von Photorezeptoren wird durch den Chromophor festgelegt, der in Säugetieren aus Vitamin A₁ besteht. Durch die Verwendung von Vitamin A₂ statt Vitamin A₁ als Chromophor kann die spektrale Empfindlichkeit eines Photorezeptors in rötlichere Lichtwellenlängenbereiche verschoben werden. Cyp27c1 ist ein Enzym aus der Cytochrom-P450-Gruppe, das durch die Umwandlung von Vitamin A₁ in Vitamin A₂ in den Sehpigmenten von bestimmten Fischen ein erweitertes Sehspektrum im rotverschobenen Bereich ermöglicht. In dieser Arbeit konnte ich Cyp27c1 erstmalig als optogenetische Methode anwenden und zeigen, dass die enzymatische Umwandlung von Vitamin A₁ zu Vitamin A₂ durch Cyp27c1-Expression in HEK-293 Zellen zu einer Rotverschiebung der spektralen Empfindlichkeit des lichtgesteuerten Ionenkanals Channelrhodopsin-2 (ChR2) und seiner rotverschobenen Variante ReaChR führt. Dazu habe ich mit Patch-Clamp-Technik die Photoströme von ChR2 oder ReaChR in HEK293-Zellen bei verschiedenen Wellenlängen gemessen und die spektrale Empfindlichkeit analysiert. Die Inkubation von HEK293-Zellen mit Vitamin A₂ führte zu einer Rotverschiebung der Wellenlänge mit halbmaximalen Strömen ($\lambda_{50\%}$) um 6,8 nm für ChR2 und 12,4 nm für ReaChR. Cyp27c1-GFP wurde in HEK293-Zellen exprimiert, eine mitochondriale Lokalisation von Cyp27c1 gezeigt und mittels HPLC-Analyse eine Umwandlung von Vitamin A₁ in Vitamin A₂ durch Cyp27c1 nachgewiesen. Bei gleichzeitiger Expression von Cyp27c1 und ChR2 waren die Photoströme bei 550 nm etwa doppelt so hoch im Vergleich zur Kontrolle ohne Cyp27c1-Expression und $\lambda_{50\%}$ wurde um 10,5 nm

ins Rötliche verschoben. In ReaChR verschob Cyp27c1 $\lambda_{50\%}$ um 14,3 nm und erhöhte die Photoströme bei 650 nm knapp um das Dreifache. Da das Hinzugeben von Vitamin A₂ für die Optogenetik in vivo keine praktikable Option ist und die Expression von Cyp27c1 zu einer geringfügig besseren Rotverschiebung geführt hat, ist die Expression von Cyp27c1 eine vielversprechende Strategie zur Rotverschiebung der spektralen Empfindlichkeit optogenetischer Rezeptoren.

1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Babino D, Perkins BD, Kindermann A, Oberhauser V, Lintig J. The role of 11-cis-retinyl esters in vertebrate cone vision. *The FASEB Journal* 2015; 29: 216–226

Barua AB, Furr HC. Properties of Retinoids. In: Redfern CPF, Hrsg. *Retinoid Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press, 1998: 3–28

Bruegmann T, Boyle PM, Vogt CC, Karathanos TV, Arevalo HJ, Fleischmann BK, Trayanova NA, Sasse P. Optogenetic defibrillation terminates ventricular arrhythmia in mouse hearts and human simulations. *The Journal of clinical investigation* 2016; 126: 3894–3904

Bruegmann T, Malan D, Hesse M, Beiert T, Fuegemann CJ, Fleischmann BK, Sasse P. Optogenetic control of heart muscle in vitro and in vivo. *Nature Methods* 2010; 7: 897–900

Chen S, Weitemier AZ, Zeng X, He L, Wang X, Tao Y, Huang AJY, Hashimoto-dani Y, Kano M, Iwasaki H, Parajuli LK, Okabe S, Teh DBL, Ali AH, Tsutsui-Kimura I, Tanaka KF, Liu X, McHugh TJ. Near-infrared deep brain stimulation via upconversion nanoparticle-mediated optogenetics. *Science* 2018; 359: 679–684

Corbo JC. Vitamin A1/A2 chromophore exchange: Its role in spectral tuning and visual plasticity. *Developmental biology* 2021; 475: 145–155

Deisseroth K. Optogenetics. *Nature Methods* 2011; 8: 26–29

Deisseroth K. Optogenetics: 10 years of microbial opsins in neuroscience. *Nature Neuroscience* 2015; 18: 1213–1225

Deisseroth K, Hegemann P. The form and function of channelrhodopsin 2017; 357

Emiliani V, Entcheva E, Hedrich R, Hegemann P, Konrad KR, Lüscher C, Mahn M, Pan Z-H, Sims RR, Vierock J, Yizhar O. Optogenetics for light control of biological systems. *Nature reviews. Methods primers* 2022; 2

Enright JM, Toomey MB, Sato S, Temple SE, Allen JR, Fujiwara R, Kramlinger VM, Nagy LD, Johnson KM, Xiao Y, How MJ, Johnson SL, Roberts NW, Kefalov VJ, Guengerich FP, Corbo JC. Cyp27c1 red-shifts the spectral sensitivity of photoreceptors by converting vitamin A1 into A2. *Current biology : CB* 2015; 25: 3048–3057

Gerhards J, Volkov LI, Corbo JC, Malan D, Sasse P. Enzymatic vitamin A2 production enables red-shifted optogenetics. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 2023; 475: 1409–1419

Govorunova EG, Sineshchekov OA, Spudich JL. Emerging Diversity of Channelrhodopsins and Their Structure-Function Relationships. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 2022; 15: 800313

Johnson KM, Phan TTN, Albertolle ME, Guengerich FP. Human mitochondrial cytochrome P450 27C1 is localized in skin and preferentially desaturates trans-retinol to 3,4-dehydroretinol. *The Journal of biological chemistry* 2017; 292: 13672–13687

Joshi J, Rubart M, Zhu W. Optogenetics: Background, Methodological Advances and Potential Applications for Cardiovascular Research and Medicine. *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 2019; 7: 466

Kandori H. Biophysics of rhodopsins and optogenetics. *Biophysical reviews* 2020; 12: 355–361

Kane MA, Napoli JL. Quantification of Endogenous Retinoids. In: Sun H, Travis GH, Hrsg. *Retinoids*. Totowa, NJ: Humana Press, 2010: 1–54

Karathanos TV, Bayer JD, Wang D, Boyle PM, Trayanova NA. Opsin spectral sensitivity determines the effectiveness of optogenetic termination of ventricular fibrillation in the human heart: a simulation study. *The Journal of physiology* 2016; 594: 6879–6891

Kiser PD, Golczak M, Palczewski K. Chemistry of the retinoid (visual) cycle. *Chemical reviews* 2014; 114: 194–232

- Klapoetke NC, Murata Y, Kim SS, Pulver SR, Birdsey-Benson A, Cho YK, Morimoto TK, Chuong AS, Carpenter EJ, Tian Z, Wang J, Xie Y, Yan Z, Zhang Y, Chow BY, Surek B, Melkonian M, Jayaraman V, Constantine-Paton M, Wong GK-S, Boyden ES. Independent optical excitation of distinct neural populations. *Nature Methods* 2014; 11: 338–346
- Kramlinger VM, Nagy LD, Fujiwara R, Johnson KM, Phan TTN, Xiao Y, Enright JM, Toomey MB, Corbo JC, Guengerich FP. Human Cytochrome P450 27C1 Catalyzes 3,4-Desaturation of Retinoids. *FEBS letters* 2016; 590: 1304–1312
- Krook-Magnuson E, Armstrong C, Oijala M, Soltesz I. On-demand optogenetic control of spontaneous seizures in temporal lobe epilepsy. *Nature Communications* 2013; 4: 1376
- Lehtinen K, Nokia MS, Takala H. Red Light Optogenetics in Neuroscience. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 2021; 15: 778900
- Lin JY. A user's guide to channelrhodopsin variants: features, limitations and future developments. *Experimental Physiology* 2011; 96: 19–25
- Lin JY, Knutsen PM, Muller A, Kleinfeld D, Tsien RY. ReaChR: A red-shifted variant of channelrhodopsin enables deep transcranial optogenetic excitation. *Nature Neuroscience* 2013; 16: 1499–1508
- Michaëlsson K, Lithell H, Vessby B, Melhus H. Serum Retinol Levels and the Risk of Fracture. *New England Journal of Medicine* 2003; 348: 287–294
- Morshedean A, Toomey MB, Pollock GE, Frederiksen R, Enright JM, McCormick SD, Cornwall MC, Fain GL, Corbo JC. Cambrian origin of the CYP27C1-mediated vitamin A1-to-A2 switch, a key mechanism of vertebrate sensory plasticity. *Royal Society Open Science* 2017; 4: 170362
- Rouillard AD, Gundersen GW, Fernandez NF, Wang Z, Monteiro CD, McDermott MG, Ma'ayan A. The harmonizome: a collection of processed datasets gathered to serve

and mine knowledge about genes and proteins. Database : the journal of biological databases and curation 2016; 2016

Sahel J-A, Boulanger-Scemama E, Pagot C, Arleo A, Galluppi F, Martel JN, Degli Esposti S, Delaux A, Saint Aubert J-B de, Montleau C de, Gutman E, Audo I, Duebel J, Picaud S, Dalkara D, Blouin L, Taiel M, Roska B. Partial recovery of visual function in a blind patient after optogenetic therapy. *Nature Medicine* 2021; 27: 1223–1229

Shen Y-C, Sasaki T, Matsuyama T, Yamashita T, Shichida Y, Okitsu T, Yamano Y, Wada A, Ishizuka T, Yawo H, Imamoto Y. Red-Tuning of the Channelrhodopsin Spectrum Using Long Conjugated Retinal Analogues. *Biochemistry* 2018; 57: 5544–5556

Sineshchekov OA, Govorunova EG, Wang J, Spudich JL. Enhancement of Long-Wavelength Sensitivity of Optogenetic Microbial Rhodopsins by 3,4-Dehydroretinal. *Biochemistry* 2012; 51: 4499–4506

Soares-Mota M, Silva TA, Gomes LM, Pinto MAS, Mendonça LMC, Farias MLF, Nunes T, Ramalho A, Zaltman C. High prevalence of vitamin A deficiency in Crohn's disease patients according to serum retinol levels and the relative dose-response test. *World Journal of Gastroenterology : WJG* 2015; 21: 1614–1620

Vahlquist A, Andersson E, Coble BI, Rollman O, Törmä H. Increased concentrations of 3,4-didehydroretinol and retinoic acid-binding protein (CRABP II) in human squamous cell carcinoma and keratoacanthoma but not in basal cell carcinoma of the skin. *The Journal of investigative dermatology* 1996; 106: 1070–1074

Volkov LI, Kim-Han JS, Saunders LM, Poria D, Hughes AEO, Kefalov VJ, Parichy DM, Corbo JC. Thyroid hormone receptors mediate two distinct mechanisms of long-wavelength vision. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2020; 117: 15262–15269

Weissleder R. A clearer vision for in vivo imaging. *Nature biotechnology* 2001; 19: 316–317

Xie L, Song Y, Lin T, Guo H, Wang B, Tang G, Liu C, Huang W, Yang Y, Ling W, Zhang Y, Li J, Huo Y, Wang X, Zhang H, Qin X, Xu X. Association of plasma retinol levels with incident cancer risk in Chinese hypertensive adults: a nested case-control study. *The British Journal of Nutrition* 2019; 122: 293–300

Babino D, Perkins BD, Kindermann A, Oberhauser V, Lintig J. The role of 11-cis-retinyl esters in vertebrate cone vision. *The FASEB Journal* 2015; 29: 216–226

2. Veröffentlichungen

Dieser Publikationsdissertation liegt die folgende, unabhängig begutachtete Veröffentlichung zugrunde:

Gerhards J, Volkov LI, Corbo JC, Malan D, Sasse P. Enzymatic vitamin A2 production enables red-shifted optogenetics. Pflugers Archiv: European journal of physiology 2023; 475: 1409–1419

<https://doi.org/10.1007/s00424-023-02880-2>

3. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Institut für Physiologie I unter Betreuung von P. Sasse durchgeführt. Die Konzeption der Arbeit erfolgte durch P. Sasse, D. Malan und J. Gerhards. J. Gerhards führte mit Unterstützung von D. Malan die Patch-Clamp Messungen und Analysen durch. L. Volkov führte die HPLC Messung und Analyse durch, die Interpretation erfolgte durch L. Volkov, J. Corbo, J. Gerhards und P. Sasse. J. Gerhards und D. Malan führten die Immunfärbungen durch. Die Datenauswertung und Interpretation wurden von J. Gerhards mit Unterstützung von D. Malan und P. Sasse durchgeführt. J. Gerhards hat somit maßgeblichen Anteil an der Planung der wissenschaftlichen Arbeit, der Datenerhebung, der Auswertung und Interpretation gehabt.

Für die Erstellung des ersten Manuskripts dieser Arbeit legte ich den Text der oben genannten Publikation zugrunde und verwendete abschnittsweise DeepL als Übersetzungshilfe. Alle Passagen wurden anschließend von mir bearbeitet, sprachlich und inhaltlich überprüft und angepasst. Ich übernehme die volle Verantwortung für den Inhalt der veröffentlichten Dissertationsschrift.

Ich versichere, die Dissertationsschrift selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

4. Danksagung

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater Philipp Saße für die hervorragende Betreuung während der gesamten Promotion bedanken. Ich bin sehr dankbar für sämtliche Erfahrungen, die ich in dieser Zeit vom ersten Praktikum im Labor bishin zur Publikation und Fertigstellung der Arbeit machen durfte. Die unermüdliche Bereitschaft, neue Daten und Interpretationen zu diskutieren und zu hinterfragen und kreative, zielorientierte Lösungswege für auftretende Probleme zu suchen, wird mir auch in Zukunft Inspiration und Vorbild sein. Ich danke Daniela Malan für die Unterstützung im Labor, für die vielen guten Hinweise, die das Projekt immer wieder bereichert haben und für ihre Geduld. Bedanken möchte ich mich auch bei den technischen Assistenten Frank Holst und Isabel Blameuser, die mir die Grundlagen der Zellkultur und andere labortechnische Grundlagen gezeigt haben. Ich bedanke mich ebenfalls bei allen anderen Mitarbeitenden der Arbeitsgruppe für den zuverlässigen, freundlichen und konstruktiven Austausch.

Mein Dank gilt außerdem meinen Eltern Stefanie und Wolfgang, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht entstanden wäre.

5. Publikationen (PDF-Version)

Pflügers Archiv - European Journal of Physiology (2023) 475:1409–1419
<https://doi.org/10.1007/s00424-023-02880-2>

ORIGINAL ARTICLE



Enzymatic vitamin A₂ production enables red-shifted optogenetics

Johanna Gerhards¹ · Leo I. Volkov² · Joseph C. Corbo² · Daniela Malan¹ · Philipp Sasse¹

Received: 12 May 2023 / Revised: 20 October 2023 / Accepted: 3 November 2023 / Published online: 21 November 2023
 © The Author(s) 2023

Abstract

Optogenetics is a technology using light-sensitive proteins to control signaling pathways and physiological processes in cells and organs and has been applied in neuroscience, cardiovascular sciences, and many other research fields. Most commonly used optogenetic actuators are sensitive to blue and green light, but red-light activation would allow better tissue penetration and less phototoxicity. Cyp27c1 is a recently deorphanized cytochrome P450 enzyme that converts vitamin A₁ to vitamin A₂, thereby red-shifting the spectral sensitivity of visual pigments and enabling near-infrared vision in some aquatic species. Here, we investigated the ability of Cyp27c1-generated vitamin A₂ to induce a shift in spectral sensitivity of the light-gated ion channel Channelrhodopsin-2 (ChR2) and its red-shifted homolog ReaChR. We used patch clamp to measure photocurrents at specific wavelengths in HEK 293 cells expressing ChR2 or ReaChR. Vitamin A₂ incubation red-shifted the wavelength for half-maximal currents ($\lambda_{50\%}$) by 6.8 nm for ChR2 and 12.4 nm for ReaChR. Overexpression of Cyp27c1 in HEK 293 cells showed mitochondrial localization, and HPLC analysis showed conversion of vitamin A₁ to vitamin A₂. Notably, the $\lambda_{50\%}$ of ChR2 photocurrents was red-shifted by 10.5 nm, and normalized photocurrents at 550 nm were about twofold larger with Cyp27c1 expression. Similarly, Cyp27c1 shifted the $\lambda_{50\%}$ of ReaChR photocurrents by 14.3 nm and increased normalized photocurrents at 650 nm almost threefold.

Since vitamin A₂ incubation is not a realistic option for *in vivo* applications and expression of Cyp27c1 leads to a greater red-shift in spectral sensitivity, we propose co-expression of this enzyme as a novel strategy for red-shifted optogenetics.

Keywords Optogenetics · ChR2 · ReaChR · Vitamin A₂ · Cyp27c1

Introduction

Optogenetics is a technique that involves the use of light to control the function of genetically modified cells or organs with light-sensitive proteins. In the last decade, optogenetics has become a powerful method for light-induced modulation of electrical excitability, calcium influx, or stimulation of intracellular signaling pathways with high temporal and spatial precision [9]. Several optogenetic actuators of the rhodopsin family containing light-gated ion channels or pumps have been described and used for various applications [3,

4, 9, 21]. Among these, ChR2, a light-induced cation channel, was used to depolarize cardiomyocytes *in vitro* and in the intact mouse heart, enabling pacing the whole heart [6]. Using stronger, spatially extended, and longer periods of illumination, ChR2 can also be used to defibrillate the heart and to terminate ventricular arrhythmia if sufficient transmural activation of ChR2 is achieved [5].

ChR2 and its homologs are maximally activated by light between 450 nm and 545 nm [20]. However, light in this range has limited organ penetration because it is strongly absorbed and scattered by tissue and blood [5, 17]. Since red wavelengths are less readily absorbed, opsins with spectral sensitivity in the red to near-infrared range (650 nm–900 nm) would enable better tissue penetrance [7, 17]. Several red-shifted channelrhodopsin variants have been developed by mutagenesis and screening, but most have less optimal properties such as lower expression levels and reduced photocurrents, or slower gating kinetics than the classical ChR2 [7, 18, 28]. One promising red-shifted homolog is ReaChR,

✉ Daniela Malan
 daniela.malan@uni-bonn.de

✉ Philipp Sasse
 philipp.sasse@uni-bonn.de

¹ Institute of Physiology I, Medical Faculty, University of Bonn, 53125 Bonn, Germany

² Department of Pathology and Immunology, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO 63110, USA

with an activation maximum between 590 and 630 nm when measuring stationary plateau photocurrents [15, 19].

Another strategy for achieving red-shifted sensitivity of optogenetic actuators would be to exchange the chromophore of the optogenetic actuator [27, 28]. Vitamin A₁-derived all-trans-retinal, the common chromophore in microbial opsins, can be replaced by vitamin A₂-derived all-trans 3,4-didehydroretinal, which has a red-shifted absorption spectrum due to an extended system of conjugated double bonds [24, 27]. The use of this chromophore in photoreceptors in cold-blooded vertebrates enhances vision in turbid aquatic environments where long wavelength light predominates [14]. Application of high concentrations of exogenous all-trans 3,4-didehydroretinal to ChR2 was shown to result in a 30–40 nm red-shift of half-maximal currents [28]. Nevertheless, substitution of all-trans 3,4-didehydroretinal is not a convenient option for optogenetic stimulation in living organisms because endogenous vitamin A₁ in the form of all-trans-retinol is the predominant form in the mammalian system [10, 22, 29, 31] and would outcompete exogenously supplied vitamin A₂ [28].

Recently, the enzyme responsible for converting vitamin A₁ to A₂ in the visual pigments of some fish and amphibians was discovered to be Cyp27c1, a dehydrogenase belonging to the Cytochrome P450 family [10]. Here, we show that the co-expression of Cyp27c1 with an optogenetic actuator provides a novel strategy to achieve red-shifted optogenetics. We expressed Cyp27c1 together with ChR2 as well as with the red-shifted homolog ReaChR in HEK 293 cells and analyzed the spectral sensitivity of photocurrents. We showed that Cyp27c1 overexpression in HEK cells results in the conversion of vitamin A₁ to A₂, leading to a red-shift in the spectral sensitivity of both ChR2 and ReaChR channelrhodopsins.

Methods

Generation of the CAG CYP27c1 EGFP Vector

To stably express zebrafish (*Danio rerio*) Cyp27c1 we engineered an expression vector by digesting the AAV_pVDM2_Dr_Cyp vector [10] containing Cyp27c1 and EGFP linked by a T2A self-cleaving peptide with BspI and BsrGI. The resulting 3009 bp fragment was subcloned into the 5895 bp fragment of the pCAG hChR2-EYFP vector [6] digested with the same enzymes and containing a neomycin selection cassette. The resulting vector CAG-Cyp27c1-EGFP was verified by restriction enzyme analysis and sequencing. The pEGFP-N1_ReaChR_mCerulean vector was received from J. Tierrock for expression of ReaChR mCerulean under the control of a CMV promoter.

HEK 293 cell transfection and culture

HEK 293 cells (AD-293, ATTC) were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Life Technologies) supplemented with 10% FCS (Capricorn Scientific), 0.1 mM nonessential amino acids, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin and 0.1 mM β-mercaptoethanol (all supplements Thermofisher), plated onto fibronectin coated coverslips (20,000 cells on 22 mm² glass coverslips) and grown for 24 h. Transfection was performed at 60–80% confluence with Fugene HD (Promega) using 2–3 µg DNA per well. To obtain a stable Cyp27c1 cell line, CAG-Cyp27c1-EGFP was linearized with PvuI before transfection and cells were selected with G418 (Thermofisher, 600 µg/ml). ChR2 or ReaChR was transfected transiently and cells were investigated after 48–72 h of culture in FCS-free Panserin 293A medium (Pan Biotech) in which vitamin A₁ (as retinol-acetate) is present at 0.4 µM as stated by the supplier. For some patch clamp and HPLC experiments the medium was supplemented with vitamin A₁ (all-trans-retinol, R7632, Sigma) or vitamin A₂ (all-trans-3,4-didehydroretinol, sc-209587, Santa Cruz Biotechnology) for at least 24 h.

Patch clamp analysis of photocurrents

Patch clamp recordings were performed using an EPC10 amplifier (Heka) at 10 kHz sampling rate on a Nikon Ti2 microscope with 20x objective (S Fluor DIC M/N2 Nikon) at 35 ± 2°C with an external solution of (in mM) 140 NaCl, 5.4 KCl, 1.8 CaCl₂, 2 MgCl₂, 10 glucose, 10 Hepes (pH 7.4, NaOH), and an internal solution of 50 KCl, 80 K-aspartate, 1 MgCl₂, 3 MgATP, 10 EGTA, 10 HEPES (pH 7.2, KOH). Pipettes were pulled from borosilicate glass (BF 150-86-10, Scientific Products) at a tip resistance of 4–6 MΩ using a P-1000 puller (Sutter Instrument). Only ChR2-EYFP or ReaChR-Cerulean positive cells were investigated. Light was generated at 10 nm wavelength steps with a Xenon arc lamp-based monochromator (Optoscan, Cairn) controlled by the patch clamp amplifier and a custom-coded microcontroller (Arduino) to obtain a uniform slit bandwidth of 30 nm. The activation spectrum was analyzed from 480 nm to 600 nm for ChR2 and from 590 nm to 700 nm for ReaChR. Light intensities were calibrated at the objective plane using a power meter (PM100A with S170C sensor, Thorlabs) and reported in Table 1.

Photocurrents were evoked every 6 s at a holding potential of -40 mV and steady-state currents were measured at the end of a 500 ms light pulse (300–495 ms after the start of illumination) subtracted by baseline currents (250–475

Table 1: Mean light intensities at indicated wavelengths obtained from the monochromator at the objective plane

ChR2 (nm)	480	490	500	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
mW/mm ²	7.2	6.7	6.4	6.1	5.9	5.6	5.4	5.1	4.8	4.6	4.3	4.0	3.7
ReaChR (nm)	590	600	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700	
mW/mm ²	3.7	3.4	3.2	2.9	2.7	2.6	2.6	2.7	2.7	2.6	2.4	2.1	

ms after end of illumination). Photocurrents were normalized to the cell capacity. Because we measured saturating photocurrents (see also discussion), photocurrents were not normalized to differences in light intensity. Photocurrents are presented as absolute currents, or to account for cell-to-cell variability in expression, for spectral comparisons photocurrents were normalized to the maximal value of each cell.

Immunohistochemistry

Cells were fixed in 4% PFA and stained with anti-Cyp27c1 ([10], 1:300) or mitochondrial ATP synthase F1- β antibody (provided by W. Voos, 1:80) for 2 h. Alexa-Fluor goat anti-rabbit 647 or Alexa Fluor goat anti-mouse 555 (Life Technologies) secondary antibodies (1:400) were then applied for 1 h in a solution with 1 μ g/ml Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) as a nuclear counterstain. Immunostainings were imaged using a Zeiss LSM confocal or a Nikon Eclipse Ti2 microscope.

High performance liquid chromatography (HPLC)

HEK 293 cells incubated in vitamin A₁ (all-trans-retinol) were detached, centrifuged, frozen on dry ice and stored at -80°C. Samples were subsequently thawed and homogenized in cold 0.9% NaCl solution by sonication. A small portion of the homogenized sample was used to measure protein content for normalization. Retinaldehydes were derivatized and analyzed by HPLC as previously described [30]. Retinoids were identified by comparison to retinol and 3,4-didehydroretinol standards as well as the published literature [1, 12, 23]. Standard curves were generated using retinol (R7632, Sigma) for the quantification of A₁ retinols (all-trans-retinol and 13-cis-retinol) and 3,4-didehydroretinol (sc-209587, Santa Cruz Biotechnology) for the quantification of A₂ retinols (all-trans-3,4-didehydroretinol and 13-cis 3,4-didehydroretinol). Calculations were made based on previously published extinction coefficients [2]. Because incubation of cells with 3.5 and 35 μ M vitamin A₁ showed similar results, we pooled these data for statistical analysis of the Cyp27c1 effect on vitamin A₂ production.

Statistical analysis

Data were analyzed offline using Fitmaster (Heka), Graph Pad Prism 6 (GraphPad) and Origin (OriginLab) software. Data are shown as mean $\pm$ SEM. Statistical analysis was performed with unpaired t-test or one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test. A *p* value $\leq$ 0.05 was considered statistically significant.

Results

Vitamin A₂ incubation causes a red-shift in spectral sensitivity

In order to analyze the effect of exogenously supplied vitamin A₁ or vitamin A₂ on the spectral sensitivity of ChR2, we incubated HEK 293 cells expressing ChR2 in fusion with EYFP (Fig. 1a) with vitamin A₁ (A₁, 25 μ M) or vitamin A₂ (A₂, 25 μ M) and measured photocurrents in response to exposure to light of varying wavelengths. We supplied vitamin A₁ and A₂ as the retinol form to mimic the in vivo situation where the majority of circulating vitamin A is in the alcohol form. We assume that the alcohol form is converted by cells at low rates into the aldehyde form by endogenous dehydrogenases and then taken up by the optogenetic actuators (see Discussion). The response to 480 nm light is shown in Fig. 1b. To precisely control the concentration of vitamin A₁ or A₂ in the medium, we used the serum-free medium Panserin 293A, which contains 0.4 μ M vitamin A₁ (as all-trans-retinol) because standard FCS contains undefined quantities of vitamin A. As shown previously [28], vitamin A₂ incubation led to a red-shift of the spectral sensitivity of ChR2 (Fig. 1c, arrow) and increased photocurrents at wavelengths between 525 nm and 600 nm (Fig. 1d). The wavelength at which half-maximal currents are obtained ($\lambda_{50\%}$) was red-shifted by 6.8 nm after vitamin A₂ incubation. At 550 nm, where the effect can be clearly seen, cells incubated with vitamin A₂ reached $24.5 \pm 0.5\%$, whereas only $19.2 \pm 1.0\%$ of the maximal photocurrent was measured in cells incubated with vitamin A₁ (Fig. 1e). Absolute photocurrents were not different (Fig. 1f) most likely because maximal photocurrents were larger in vitamin A₁ than in vitamin A₂, which was discussed before [8].

Next, we investigated the effect of vitamin A₂ on the red-shifted channelrhodopsin variant ReaChR. Consistent

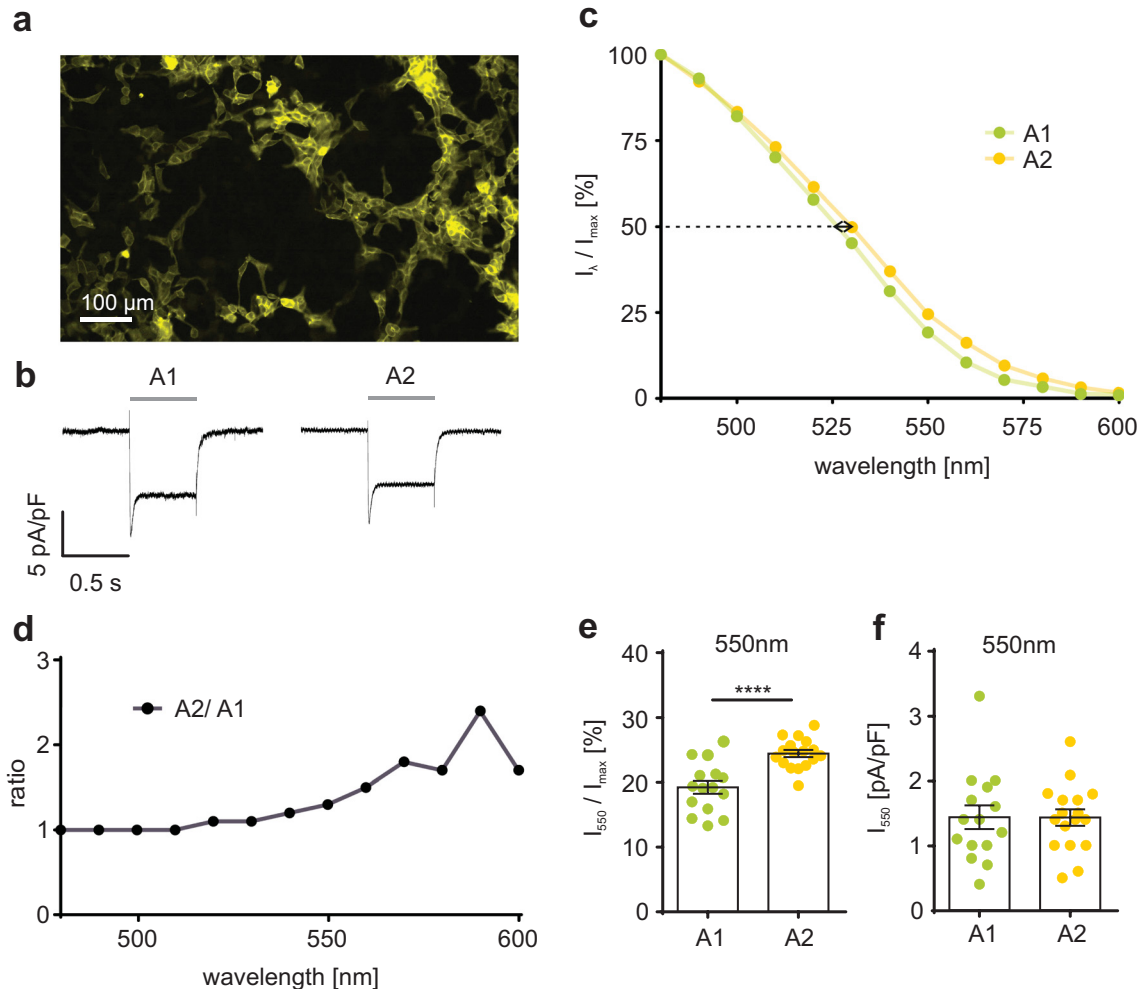


Fig. 1 Spectral sensitivity of ChR2. **a** Expression of ChR2 in fusion to EYFP (yellow) in HEK 293. **b** Representative ChR2 currents evoked by illumination (480 nm, 0.5 s, grey line) in ChR2 expressing HEK 293 cells in Panzerin 293A medium supplemented with 25 μ M vitamin A₁ (A1) or vitamin A₂ (A2) 24–48 h before experiments. **c** ChR2 steady-state photocurrent at different wavelengths in relation

to the maximal current for each cell in the presence of vitamin A₁ (25 μ M, $n = 15$) or A₂ (25 μ M, $n = 17$). Spectral difference at 50% photocurrent highlighted by black arrow. **d** Ratio of normalized ChR2 currents in the presence of vitamin A₂ and A₁. **e,f** Quantification of normalized (**e**) and absolute (**f**) ChR2 photocurrents at 550 nm in the presence of vitamin A₁ and A₂. **** $p \leq 0.0001$

with our ChR2 experiments (Fig. 1), HEK 293 cells with stable expression of ReaChR in fusion to Cerulean (Fig. 2a, b) showed a significant red-shift of 12.4 nm of $\lambda_{50\%}$ after incubation with vitamin A₂ (Fig. 2c). ReaChR-expressing cells incubated with vitamin A₂ showed ~2.5-fold higher photocurrents at the long wavelength edge (~660 nm) of spectral sensitivity than those incubated with vitamin A₁ (Fig. 2d). For instance, cells incubated with vitamin A₁ achieved $11.0 \pm 0.7\%$ at 650 nm, whereas cells incubated with vitamin A₂ attained $25.7 \pm 1.4\%$ of their maximal photocurrent (Fig. 2e). Absolute photocurrents were not different (Fig. 2f) most likely because maximal photocurrents were larger in vitamin A₁. Having shown that vitamin A₂ is able to red-shift spectral sensitivity of ChR2 and ReaChR,

we expect similar effects of vitamin A₂ application in other channelrhodopsin variants.

Cyp27c1 converts vitamin A₁ to vitamin A₂

For *in vivo* optogenetic applications, the use of exogenously applied vitamin A₂ as a chromophore may not be feasible due to the predominance of vitamin A₁ in mammalian serum and tissues [10, 22, 29, 31]. In order to take advantage of the red-shifting effect of vitamin A₂ in the presence of vitamin A₁, we used the vitamin A₁-to-A₂ converting enzyme Cyp27c1 [10]. We generated a HEK 293 cell line stably expressing Cyp27c1 under the control of the CAG promoter (Fig. 3a) using neomycin

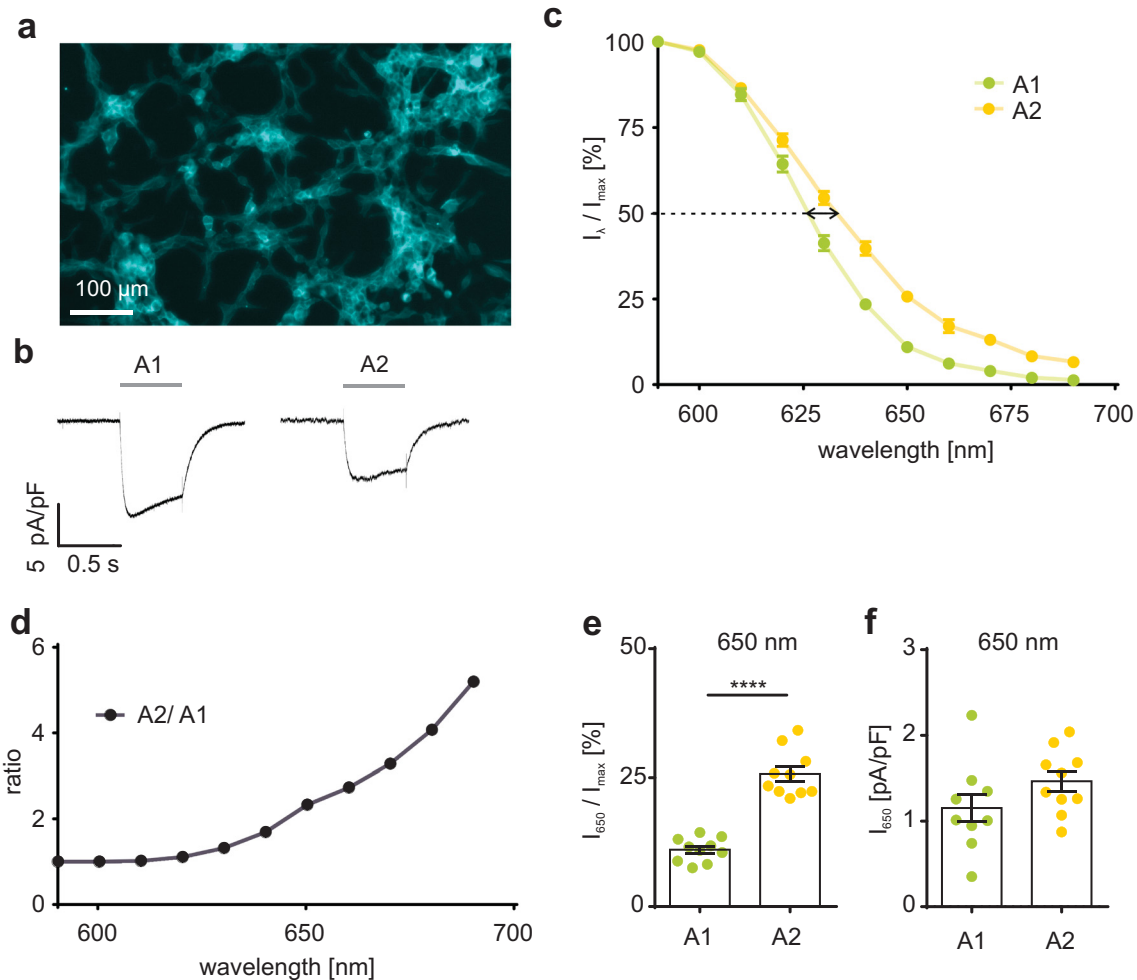


Fig. 2 Spectral sensitivity of ReaChR. **a** Expression of ReaChR in fusion to Cerulean (blue) in HEK 293 cells. **b** Representative ReaChR currents evoked by illumination (600 nm, 0.5 s, grey line) in ReaChR expressing HEK 293 cells in Panzerin 293A medium supplemented with 25 μM vitamin A₁ (A1) or vitamin A₂ (A2) 24–48 h before experiments. **c** ReaChR steady-state photocurrent at different wavelengths in relation to the maximal current for each cell in

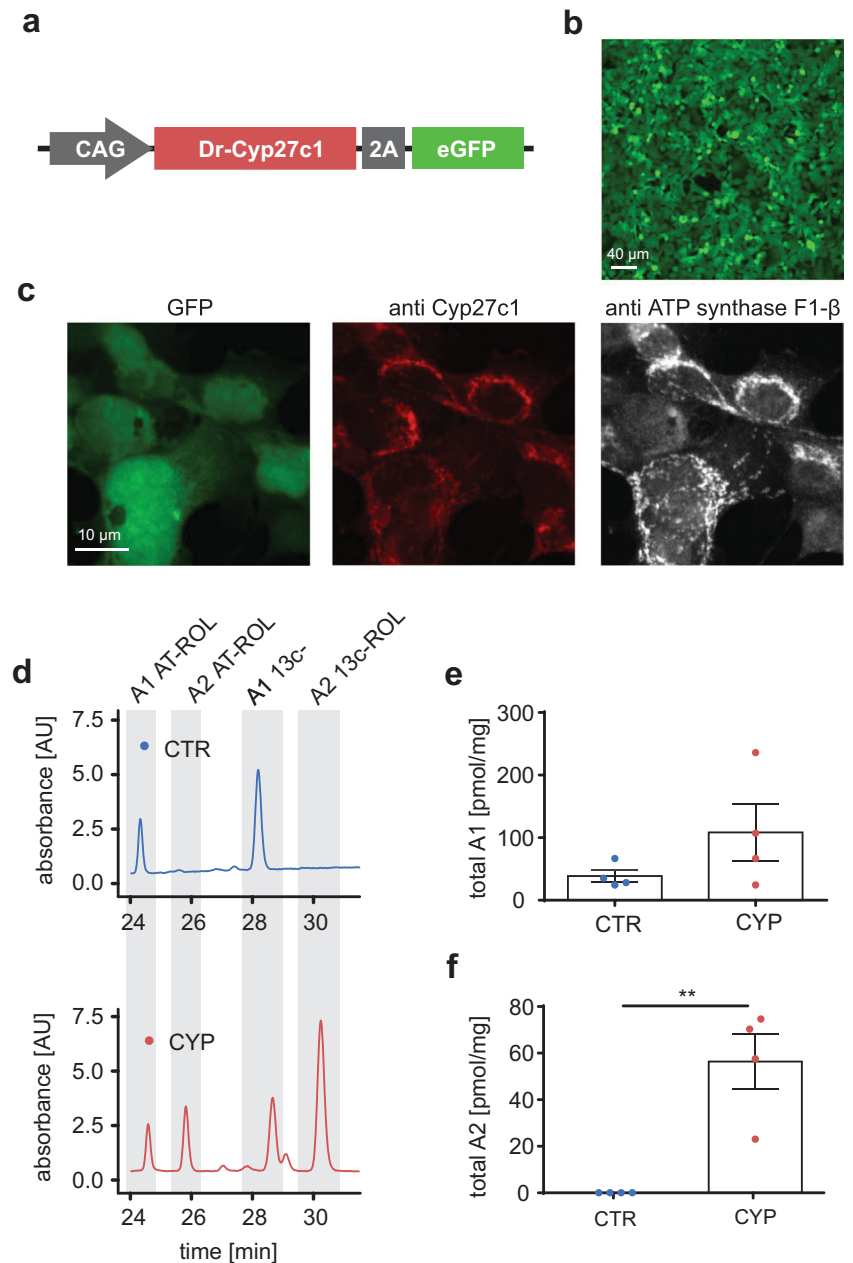
the presence of vitamin A₁ (25 μM, n = 10) or A₂ (25 μM, n = 10). Spectral difference at 50% photocurrent highlighted by black arrow. **d** Ratio of normalized ReaChR currents in the presence of vitamin A₂ and A₁. **e,f** Quantification of normalized (**e**) and absolute (**f**) ReaChR photocurrents at 650 nm in the presence of vitamin A₁ and A₂. **** p ≤ 0.0001

selection (Fig. 3b). Comparison of EGFP-fluorescence signals in Cyp27c1-expressing cells (Fig. 3c, green) with anti-Cyp27c1 (Fig. 3c, red) and mitochondrial staining (Fig. 3c, white) suggests mitochondrial localization of Cyp27c1. To confirm the functionality of Cyp27c1 in HEK 293 cells, we performed HPLC analysis in lysates of HEK 293 cells expressing Cyp27c1 and wild-type controls and incubated them with 3.5 or 35 μM vitamin A₁ for 24 h. HPLC analysis showed the presence of both vitamin A₁ and A₂ in cells expressing Cyp27c1 but only vitamin A₁ in control cells (Fig. 3, d-f).

Cyp27c1 red-shifts the spectral sensitivity of ChR2

To analyze the effect of Cyp27c1 on the spectral sensitivity of the most commonly used optogenetic actuator, we transiently expressed ChR2-EYFP in Cyp27c1-expressing (Fig. 4a) and wild-type control HEK 293 cell lines. Analysis of photocurrents at different wavelengths showed that co-expression of Cyp27c1 leads to a red-shift of the spectral sensitivity (Fig. 4b, arrow) which was even larger than that observed after incubation with vitamin A₂ (Fig. 1c). Interestingly, the red-shifting effect of Cyp27c1 could be

Fig. 3 Cyp27c1 expression converts vitamin A₁ into vitamin A₂. **a** Plasmid for expression of zebrafish Cyp27c1 and EGFP separated by a 2A self-cleaving peptide. **b,c** HEK 293 cells stably expressing Cyp27c1-EGFP (green) in overview (**b**) and stained with antibodies (**c**) against Cyp27c1 (red) and mitochondrial ATP synthase F1-β (white). **d** HPLC analysis of HEK 293 cells without (CTR) and with Cyp27c1 (CYP) expression after incubation with 3.5 μM vitamin A₁ (all-trans retinol). Specific peaks for all-trans retinol (AT-ROL) and 13-cis retinol (13c-ROL) species of vitamin A₁ and A₂ highlighted in grey. Note the appearance of vitamin A₂ species only in Cyp27c1 expressing cells. **e,f** Quantification of total amount of vitamin A₁ (**e**, n = 4) or vitamin A₂ (**f**, n = 4) normalized to total protein level in HEK 293 cells without (CTR) and with Cyp27c1 (CYP) expression after incubation with vitamin A₁ (pooled data for 3.5 and 35 μM vitamin A₁). ** p ≤ 0.01



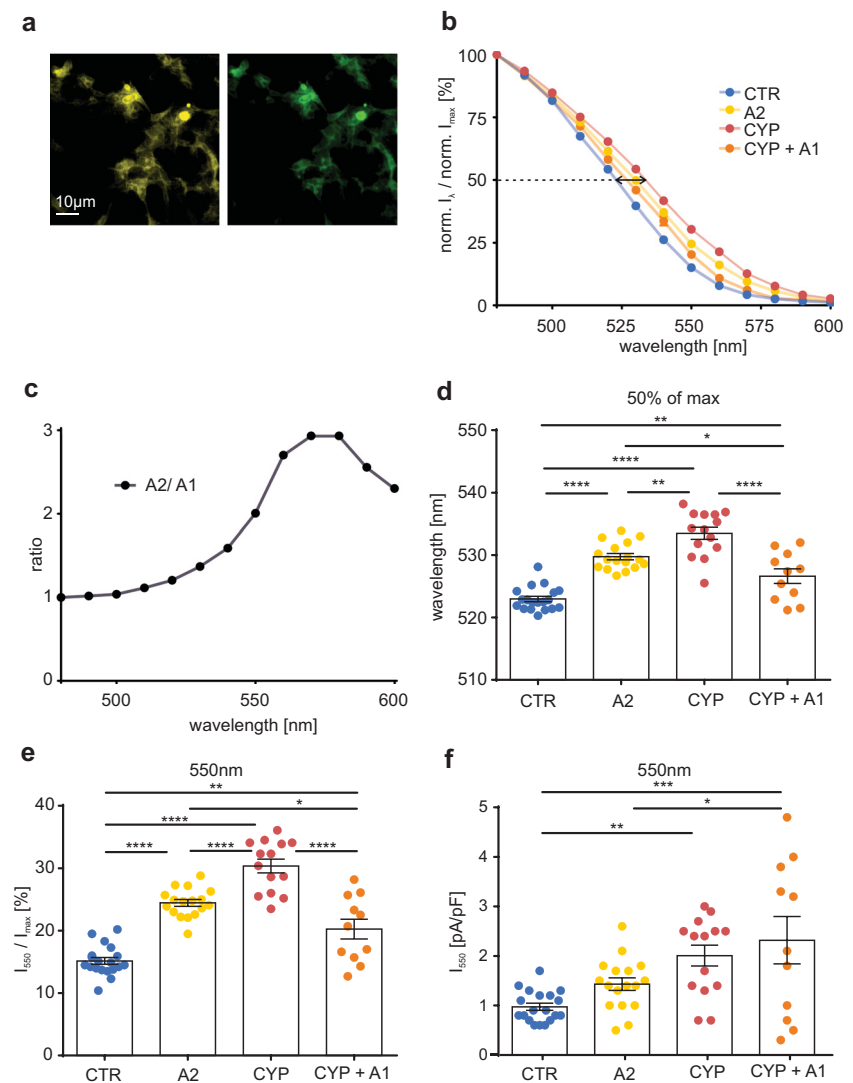
reversed by adding 5 μM vitamin A₁ to the culture medium, suggesting that the higher concentration of vitamin A₁ led to replacement of the vitamin A₂ chromophore (Fig. 4b). Photocurrents in Cyp27c1-expressing cells were up to three times higher at the long wavelength end of spectral sensitivity than control cells (Fig. 4c). Analysis of $\lambda_{50\%}$ for each cell individually showed a shift of 10.5 nm to longer wavelengths by Cyp27c1 expression (Fig. 4d), which underscores the potential benefits of Cyp27c1 co-expression for optogenetic applications. For example, at 550 nm, cells without Cyp27c1 expression reached only $15.2 \pm 0.5\%$ of their maximal currents (Fig. 4e), while Cyp27c1 expressing

cells showed almost one-third of maximal currents (Fig. 4e, $30.4 \pm 1.1\%$). Similarly, absolute photocurrents increased from 1.0 ± 0.1 pA/pF to 2.0 ± 0.2 pA/pF by Cyp27c1 expression (Fig. 4f).

Co-expression of Cyp27c1 red-shifts the spectral sensitivity of ReaChR

Co-expression of red-shifted ChR2 variants with Cyp27c1 might further extend spectral sensitivity into the far-red range. To investigate this, we tested the ChR2 homolog ReaChR in combination with Cyp27c1. HEK 293 cells

Fig. 4 Cyp27c1 co-expression red-shifts the spectral sensitivity of ChR2 **a** Transient expression of ChR2-EYFP (yellow) in a HEK 293 cell line stably expressing Cyp27c1-EGFP (green). Special fluorescence filters were chosen to discriminate between EYFP and EGFP. **b** ChR2 photocurrents in relation to the maximal current for each cell in Panserin 293A medium for cells expressing Cyp27c1 without (CYP, $n = 14$) and with vitamin A₁ incubation (CYP + A₁, 5 μ M, $n = 11$) and in control cells without (CTR, $n = 19$) and with vitamin A₂ incubation (A2, 25 μ M, $n = 17$). Note that Cyp27c1 expression shifts the spectral sensitivity of ChR2 at 50% photocurrent (black arrow). **c** Ratio of normalized ChR2 photocurrents in cells expressing Cyp27c1 and control cells shows up to three times higher currents at wavelengths between 550 and 600 nm. **d** Wavelengths resulting in 50% of ChR2 photocurrents from data shown in **b** calculated for each cell by linear fitting. **e,f** Quantification of normalized (**e**) and absolute (**f**) ChR2 photocurrents at 550 nm. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, **** $p \leq 0.0001$

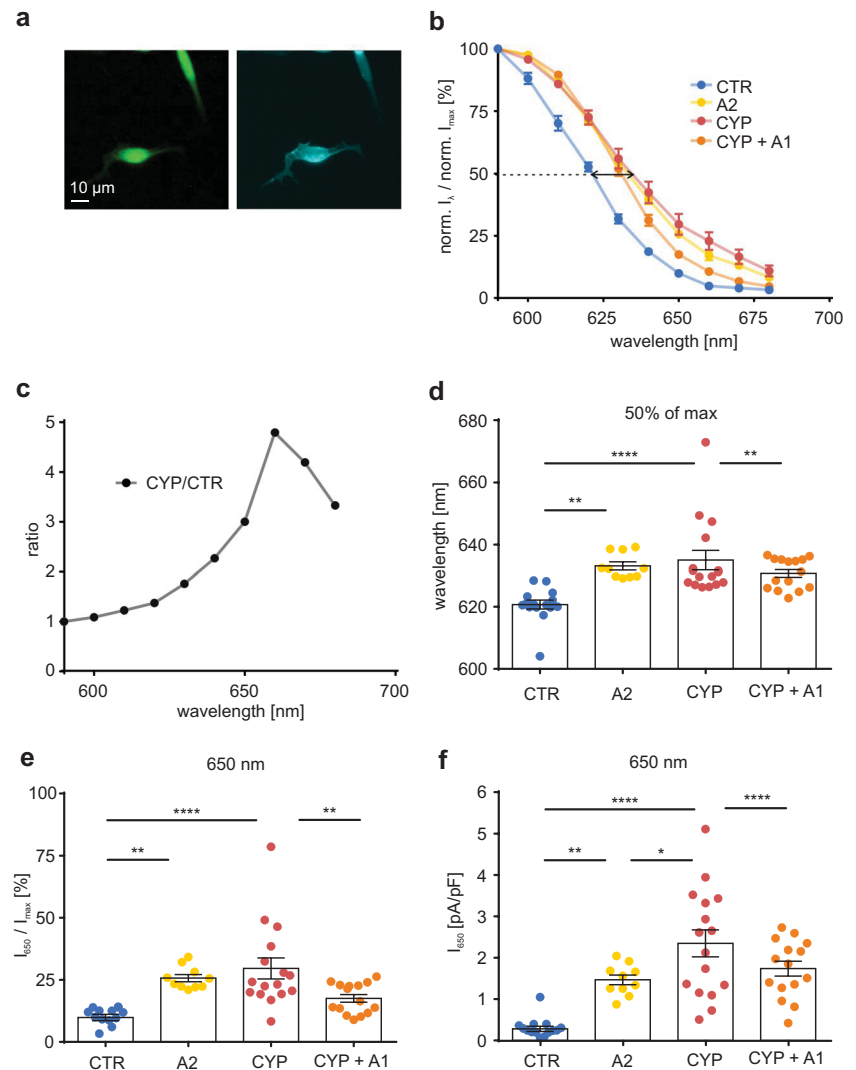


co-expressing ReaChR and Cyp27c1 (Fig. 5a) showed a significant red shift of spectral sensitivity compared to control cells without Cyp27c1 co-expression (Fig. 5b, arrow). Adding vitamin A₁ (5 μ M) reversed the effect, indicating replacement of vitamin A₂-derived chromophore by A₁. (Fig. 5b). Photocurrents of Cyp27c1-expressing cells were up to four times higher at wavelengths between 630 nm and 690 nm in comparison to cells without Cyp27c1 expression (Fig. 5c). For example, at 650 nm, control cells only achieved $9.9 \pm 1.3\%$ of the maximal currents whereas $29.6 \pm 4.2\%$ of maximal currents was seen in Cyp27c1 expressing cells (Fig. 5e). Similarly, absolute photocurrents increased from 0.3 ± 0.1 pA/pF to 2.3 ± 0.3 pA/pF by Cyp27c1 expression (Fig. 5f). Analysis of $\lambda_{50\%}$ for each cell individually showed 635.0 ± 3.1 nm for Cyp27c1 expressing cells and 620.7 ± 1.4 nm for control cells (Fig. 5d), which constitutes a Cyp27c1-induced red-shift of $\lambda_{50\%}$ of 14.3 nm.

Discussion

In this study, we explored the idea of red-shifting the spectral sensitivity of optogenetic actuators by co-expression of a vitamin A₁-to-A₂ converting enzyme, Cyp27c1. Consistent with the findings of Sineshchekov et al. [28], we showed that substitution of vitamin A₁ with vitamin A₂ leads to a red-shift of the spectral sensitivity of optogenetic actuators in living cells. Cyp27c1 was recently discovered to be the enzyme responsible for an enhancing near-infrared visual sensitivity by converting vitamin A₁ to vitamin A₂ in the visual pigments of aquatic vertebrates [10]. Thus, we here propose enzymatic vitamin A₂ production by Cyp27c1 as a new method to red-shift the spectral sensitivity of optogenetic actuators without the need for supplying exogenous vitamin A₂. Since longer wavelength light is less scattered and absorbed by tissue [5, 17], optogenetic actuators with spectral sensitivity in

Fig. 5 Cyp27c1 co-expression red-shifts spectral sensitivity of ReaChR **a** Transient expression of ReaChR-Cerulean (blue) in a HEK 293 cell line stably expressing Cyp27c1-EGFP (green). **b** ReaChR photocurrents in relation to the maximal current for each cell in Panzerin 293A medium for cells expressing Cyp27c1 without (CYP, $n = 15$) and with vitamin A₁ incubation (CYP + A₁, 5 μ M, $n = 14$) and in control cells without (CTR, $n = 15$) and with vitamin A₂ incubation (A2, 25 μ M, $n = 14$). Note that Cyp27c1 expression shifts the spectral sensitivity of ReaChR at 50% photocurrent (black arrow). **c** Ratio of normalized ReaChR photocurrents in cells expressing Cyp27c1 and control cells shows more than three times higher currents at wavelengths above 650 nm. **d** Wavelengths resulting in 50% of normalized ReaChR photocurrents from data shown in **b** calculated for each cell by linear fitting **e,f** Quantification of normalized (**e**) and absolute (**f**) ReaChR photocurrents at 650 nm from data shown in **b**. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, **** $p \leq 0.0001$



the red to near-infrared therapeutic window (650 nm–900 nm) can facilitate actuator operability at greater tissue depth. Several red-shifted channelrhodopsin variants have been developed from different species and using mutagenesis, but most have less optimal properties than ChR2 with respect to expression, kinetics, or ion selectivity [7, 18, 28]. So far, there is no evidence that the vitamin A₂ chromophore significantly alters fundamental functions of optogenetic actuators other than their spectral sensitivity [28], although maximum photosensitivity of A₂-based visual pigments may be reduced compared to A₁-based pigments [8]. Thus, intracellular vitamin A₂ production by Cyp27c1 is a promising alternative strategy to red-shift the spectral sensitivity of optogenetic actuators.

Sineshchekov et al. [28] describe a red-shift in the spectral sensitivity of peak photocurrents by ~30 nm for the channelrhodopsin variants CrChR1, CrChR2, CaChR1 and MvChR1 in HEK 293 cells after incubation with vitamin A₂ in aldehyde form. However, our experiments with

ChR2 and ReaChR showed only a 6.8 nm, and 12.4 nm shift in plateau photocurrents using identical vitamin A₂ concentrations (25 μ M), but in the alcohol form. Both differences (peak vs plateau and retinol vs retinal) might have contributed to the less pronounced red-shift we observed. Importantly, we specifically investigated the effect of Cyp27c1 on plateau stationary photocurrents because many optogenetic applications, including defibrillation [5] or seizure control, require not a single light pulse with peak photocurrents but repetitive or constant light-induced depolarization [5], and in this situation, peak photocurrents are desensitized [19, 20].

In contrast to earlier work that supplemented the oxidized versions of vitamin A₁ (all-trans-retinal) and vitamin A₂ (all-trans 3,4-didehydroretinal, not commercially available) [27, 28] we have supplied the reduced form (all-trans-retinol) because it is the dominant form in serum and tissue [10, 22, 29, 31] and is only converted to retinal in the eye by enzymes of the visual cycle [13]. Also, Cyp27c1 most efficiently

catalyzes the conversion of retinol [10]. Thus, our findings in cell culture using retinol can be better transferred to the *in vivo* situation. Furthermore, all-trans-retinol in Panserin 293A medium is sufficient to generate large photocurrents in HEK293 cells. This is most likely due to the interconversion of retinal and retinol forms by endogenous dehydrogenases [13] such as the retinol dehydrogenase (RDH) 14, which is highly expressed in HEK293 cells [25]. We were not able to detect all-trans-retinal in HEK293 cells fed with all-trans-retinol by HPLC analysis after oximes derivatization (data not shown). However, the presence of photocurrents proves that these small undetectable amounts of retinal generated by RDHs are sufficient as chromophore for microbial opsins. This is not surprising because, in contrast to bleaching opsins, which require a constant supply of retinal aldehyde for recovery after every photocycle, ChR2 and other microbial opsins do not dissociate from the retinal molecule during the photocycle.

Interestingly, Sineshchekov et al. showed that the shift in spectral sensitivity due to vitamin A₂ incubation correlated with the vitamin A₂/A₁ ratio in the medium [28], indicating a competition and similar binding affinities of both vitamins in the binding pocket of optogenetic actuators. The hypothesis of a vitamin A₂/A₁ competition is supported by our findings that the Cyp27c1-induced red-shift of spectral sensitivity can be reversed by elevating the vitamin A₁ concentration (Fig. 4b,d, Fig. 5b,d). Thus, exogenous vitamin A₂ application will not be an option for *in vivo* optogenetic applications because vitamin A₁ is the predominant form in the mammalian serum and tissues [10, 22, 29, 31] and would compete with vitamin A₂ and thereby reduce the red-shifting effect. In addition, high concentrations of exogenous vitamin A₂ could have unknown systemic effects on the organism because elevated levels of 3,4-didehydroretinoids have been documented in hyperkeratotic lesions and some skin neoplasms in humans [10]. Overexpression of Cyp27c1 should also be tolerated by the immune system as orthologues can be found in most mammalian genomes, including the human genome [10]. For instance, Johnson et al. [11] report localization of Cyp27c1 in the skin although the function of vitamin A₂ remains unclear.

Our experiments showed that Cyp27c1 is able to convert 0.4 µM vitamin A₁ present in Panserin 293A medium into vitamin A₂, thereby red-shifting the spectral sensitivity of co-expressed ChR2 or ReaChR. This is in line with literature describing the catalytic efficiency of Cyp27c1 as one of the highest among animal cytochrome P450 family members [10] and a maximal catalytic efficiency at a vitamin A₁ concentrations between 0.1 and 2 µM. Because the levels of vitamin A₁ (all-trans-retinol) in human blood of 0.5–1.5 µM [22, 29, 31] are within this range, we conclude that Cyp27c1 overexpression should be effective for *in vivo* red-shifted optogenetics at physiological vitamin A₁ serum

concentrations. Furthermore, our results show a higher red-shifting effect by Cyp27c1 (ChR2: 10.5 nm and ReaChR: 14.3 nm) than by vitamin A₂ incubation (6.8 nm and 12.4 nm). This could be explained by a local intracellular production of vitamin A₂ close to the chromophore binding site at the time of opsin maturation when the chromophore is being incorporated.

The vitamin A₂-induced red-shift has been shown for numerous opsins [27, 28], corroborating the wide spectrum of possible applications of Cyp27c1 with vitamin A-based optogenetic actuators other than those we have tested. Sineshchekov et al. [28] predict the highest benefit by vitamin A₂ for rhodopsins with intrinsically long-wavelength absorption in which the additional red-shift by Cyp27c1 might significantly increase their efficiency and finally allow optogenetic activation in deep layers. We can support this notion because with ReaChR and Cyp27c1 we found half-maximal photocurrents at 635 nm, approaching the therapeutic window of 650–900 nm.

In this study, we used high light intensities from a monochromator to determine the maximum possible plateau photocurrent. This required a large bandwidth of 30 nm and resulted in non-uniform intensities across the spectrum (Table 1). ChR2 plateau currents are almost fully saturated at the light intensities we have used [20], and ReaChR plateau photocurrents are saturated at 610 nm using ~ 2 mW/mm² [19]. However, ReaChR could be not saturated for longer wavelengths which in turn would allow using higher light intensities to obtain larger photocurrents.

Potential applications of optogenetic tools in whole organisms with therapeutic purposes could be, among others, terminating ventricular tachycardia [5], seizure control in epilepsy [16], or restoring vision in patients with photoreceptor degeneration [26]. All these could benefit from optogenetic proteins with spectral sensitivity in the red-light range, enabling better tissue penetration and the use of less energetic and therefore less damaging long-wavelength photons. Given the greater red-shift due to Cyp27c1 expression compared to vitamin A₂ incubation, we propose enzymatic vitamin A₂ production by Cyp27c1 in combination with long wavelength optogenetic actuators as a complementary strategy for red-shifted optogenetics.

Acknowledgments We thank F. Holst (University of Bonn) for technical assistance, W. Voos (University of Bonn) for providing mitochondrial ATP synthase F1-β antibody and J. Vierock (Charité Berlin) for providing the ReaChR plasmid.

Authors' contributions PS and DM conceptualized the project. JG and DM performed and analyzed the patch clamp experiments, LV and JCC performed and analyzed the HPLC experiments. DM, JG and PS wrote the manuscript with input from all authors.

Funding Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL. This work was supported and funded by the Bonfor program

of the Medical Faculty Bonn (JG), the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation: SA 1785/7-1 313904155 and SA 1785/9-1 380524518 (PS) and the National Institutes of Health: HL149961 and EY030075 (JCC).

Data availability Original data will be provided upon personal and reasonable request to the corresponding authors.

Declarations

Ethical approval not applicable

Competing interests JCC holds a US patent for the use of Cyp27c1 co-expression to red-shift optogenetic actuators (United States Patent 10047130). The authors have no other financial or non-financial competing interests to disclose.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Babino D, Perkins BD, Kindermann A, Oberhauser V, von Lintig J (2015) The role of 11-cis-retinyl esters in vertebrate cone vision. *FASEB J* 29:216–226. <https://doi.org/10.1096/fj.14-261693>
- Barua AB, Furr HC (1998) Properties of retinoids: Structure, handling, and preparation. *Mol Biotechnol* 10:167–182. <https://doi.org/10.1007/BF02760863>
- Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K (2005) Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci* 8:1263–1268. <https://doi.org/10.1038/nn1525>
- Boyle PM, Karathanos TV, Trayanova NA (2018) Cardiac Optogenetics: 2018. *JACC: Clin Electrophysiol* 4:155–167. <https://doi.org/10.1016/j.jacep.2017.12.006>
- Bruegmann T, Boyle PM, Vogt CC, Karathanos TV, Arevalo HJ, Fleischmann BK, Trayanova NA, Sasse P (2016) Optogenetic defibrillation terminates ventricular arrhythmia in mouse hearts and human simulations. *J Clin Invest* 126:3894–3904. <https://doi.org/10.1172/JCI88950>
- Bruegmann T, Malan D, Hesse M, Beiert T, Fuegmann CJ, Fleischmann BK, Sasse P (2010) Optogenetic control of heart muscle in vitro and in vivo. *Nat Methods* 7:897–900. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1512>
- Chen S, Weitemier AZ, Zeng X, He L, Wang X, Tao Y, Huang AJY, Hashimoto-dani Y, Kano M, Iwasaki H, Parajuli LK, Okabe S, Teh DBL, All AH, Tsutsui-Kimura I, Tanaka KF, Liu X, McHugh TJ (2018) Near-infrared deep brain stimulation via upconversion nanoparticle-mediated optogenetics. *Science* 359:679–684. <https://doi.org/10.1126/science.aag1144>
- Corbo JC (2021) Vitamin A1/A2 chromophore exchange: Its role in spectral tuning and visual plasticity. *Dev Biol* 475:145–155. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2021.03.002>
- Deisseroth K (2015) Optogenetics: 10 years of microbial opsins in neuroscience. *Nat Neurosci* 18:1213–1225. <https://doi.org/10.1038/nn.4091>
- Enright JM, Toomey MB, Sato S, Temple SE, Allen JR, Fujiwara R, Kramlinger VM, Nagy LD, Johnson KM, Xiao Y, How MJ, Johnson SL, Roberts NW, Kefalov VJ, Guengerich FP, Corbo JC (2015) Cyp27c1 red-shifts the spectral sensitivity of photoreceptors by converting vitamin A1 into A2. *Curr Biol* 25:3048–3057. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.10.018>
- Johnson KM, Phan TTN, Albertolle ME, Guengerich FP (2017) Human mitochondrial cytochrome P450 27C1 is localized in skin and preferentially desaturates trans-retinol to 3,4-dehydroretinol. *J Biol Chem* 292:13672–13687. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.773937>
- Kane MA, Napoli JL (2010) Quantification of Endogenous Retinoids. *Methods Mol Biol* 652:1–54. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-325-1_1
- Kiser PD, Golczak M, Palczewski K (2014) Chemistry of the Retinoid (Visual) Cycle. *Chem Rev* 114:194–232. <https://doi.org/10.1021/cr400107q>
- Kramlinger VM, Nagy LD, Fujiwara R, Johnson KM, Phan TTN, Xiao Y, Enright JM, Toomey MB, Corbo JC, Guengerich FP (2016) Human Cytochrome P450 27C1 Catalyzes 3,4-Desaturation of Retinoids. *FEBS Lett* 590:1304–1312. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12167>
- Krause BS, Grimm C, Kaufmann JCD, Schneider F, Sakmar TP, Bartl FJ, Hegemann P (2017) Complex Photochemistry within the Green-Absorbing Channelrhodopsin ReaChR. *Biophys J* 112:1166–1175. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.02.001>
- Krook-Magnuson E, Armstrong C, Oijala M, Soltesz I (2013) On-demand optogenetic control of spontaneous seizures in temporal lobe epilepsy. *Nat Commun* 4:1376. <https://doi.org/10.1038/ncomms2376>
- Lehtinen K, Nokia MS, Takala H (2022) Red Light Optogenetics in Neuroscience. *Front Cell Neurosci* 15:778900. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.778900>
- Lin JY (2011) A user's guide to channelrhodopsin variants: features, limitations and future developments. *Exp Physiol* 96:19–25. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2009.051961>
- Lin JY, Knutsen PM, Muller A, Kleinfeld D, Tsien RY (2013) ReaChR: a red-shifted variant of channelrhodopsin enables deep transcranial optogenetic excitation. *Nat Neurosci* 16:1499–1508. <https://doi.org/10.1038/nn.3502>
- Lin JY, Lin MZ, Steinbach P, Tsien RY (2009) Characterization of Engineered Channelrhodopsin Variants with Improved Properties and Kinetics. *Biophys J* 96:1803–1814. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2008.11.034>
- Mager T, Morena DLDL, Senn V, Schlötte J, Derrico A, Feldbauer K, Wrobel C, Jung S, Bodensiek K, Rankovic V, Browne L, Huet A, Jüttner J, Wood PG, Letzkus JJ, Moser T, Bamberg E, Lopez D, Morena DLDL et al (2018) High frequency neural spiking and auditory signaling by ultrafast red-shifted optogenetics. *Nat Commun* 9(1):1750. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04146-3>
- Michaëlsson K, Lithell H, Vessby B, Melhus H (2003) Serum Retinol Levels and the Risk of Fracture. *N Engl J Med* 348:287–294. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa021171>
- Morshedien A, Toomey MB, Pollock GE, Frederiksen R, Enright JM, McCormick SD, Cornwall MC, Fain GL, Corbo JC (2017) Cambrian origin of the CYP27C1-mediated vitamin A₁-to-A₂ switch, a key mechanism of vertebrate sensory plasticity. *R Soc open sci* 4:170362. <https://doi.org/10.1098/rsos.170362>
- Rajamani R, Lin Y-L, Gao J (2011) The opsin shift and mechanism of spectral tuning in rhodopsin. *J Comput Chem* 32:854–865. <https://doi.org/10.1002/jcc.21663>
- Rouillard AD, Gundersen GW, Fernandez NF, Wang Z, Monteiro CD, McDermott MG, Ma'ayan A (2016) The harmonizome: a

- collection of processed datasets gathered to serve and mine knowledge about genes and proteins. Database 2016:baw100. <https://doi.org/10.1093/database/baw100>
26. Sahel J-A, Boulanger-Scemama E, Pagot C, Arleo A, Galluppi F, Martel JN, Esposti SD, Delaux A, de Saint Aubert J-B, de Montleau C, Gutman E, Audo I, Duebel J, Picaud S, Dalkara D, Blouin L, Taiel M, Roska B (2021) Partial recovery of visual function in a blind patient after optogenetic therapy. *Nat Med* 27:1223–1229. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01351-4>
 27. Shen Y-C, Sasaki T, Matsuyama T, Yamashita T, Shichida Y, Okitsu T, Yamano Y, Wada A, Ishizuka T, Yawo H, Imamoto Y (2018) Red-Tuning of the Channelrhodopsin Spectrum Using Long Conjugated Retinal Analogues. *Biochemistry* 57:5544–5556. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00583>
 28. Sineshchekov OA, Govorunova EG, Wang J, Spudich JL (2012) Enhancement of Long-Wavelength Sensitivity of Optogenetic Microbial Rhodopsins by 3,4-Dehydroretinal. *Biochemistry* 51:4499–4506. <https://doi.org/10.1021/bi2018859>
 29. Soares-Mota M (2015) High prevalence of vitamin A deficiency in Crohn's disease patients according to serum retinol levels and the relative dose-response test. *WJG* 21:1614. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i5.1614>
 30. Volkov LI, Kim-Han JS, Saunders LM, Poria D, Hughes AEO, Kefalov VJ, Parichy DM, Corbo JC (2020) Thyroid hormone receptors mediate two distinct mechanisms of long-wavelength vision. *Proc Natl Acad Sci USA* 117:15262–15269. <https://doi.org/10.1073/pnas.1920086117>
 31. Xie L, Song Y, Lin T, Guo H, Wang B, Tang G, Liu C, Huang W, Yang Y, Ling W, Zhang Y, Li J, Huo Y, Wang X, Zhang H, Qin X, Xu X (2019) Association of plasma retinol levels with incident cancer risk in Chinese hypertensive adults: a nested case–control study. *Br J Nutr* 122:293–300. <https://doi.org/10.1017/S000711451900120X>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.