

СОЗДАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМОГО СВЕТОИНДУЦИРУЕМОГО СЕНСОРА ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ЯДРЫШКА

П. А. Журлова, З. В. Беседовская, Е. Л. Соколинская, Л. В. Путляева ✉

Сколковский институт науки и технологий, Центр молекулярной и клеточной биологии, Москва, Россия

Ядрышки участвуют в усилении продукции рРНК и поддержании биогенеза рибосом в опухолевых клетках, что делает их желанной мишенью в генетических и онкологических исследованиях. Наиболее удобным методом визуализации ядрышка благодаря своей эффективности и доступности является флуоресцентная микроскопия. В настоящее время методы визуализации ядрышек либо неточны, либо непригодны для живых клеток, либо требуют постоянного окрашивания для живого мониторинга. Целью исследования было создать генетически кодируемую систему фотоиндуцируемых сенсоров (light-activated nucleolus sensor, LANS) для визуализации ядрышка в реальном времени. Комбинация домена eMags для фотоиндуцируемой димеризации и ридерного домена белка DPF3 позволяет системе LANS эффективно осуществлять направленное перемещение целевого белка в ядрышко посредством облучения клетки короткими импульсами синего света, не влияя на морфологию клеток. Данная система позволяет увеличить представленность пробы LANS2 в ядрышке в 1,5 раза относительно значений интенсивности флуоресценции, полученных до облучения ядрышка. Созданная система сенсоров LANS позволит ускорить поиск новых лекарств и улучшить первичный скрининг лекарственных соединений в моделях *in vivo*.

Ключевые слова: эпигенетика, флуоресцентные белки, eMags, оптогенетика, ядрышко

Финансирование: работа была поддержана грантом РФФИ № 22-24-01109.

✉ **Для корреспонденции:** Лидия Викторовна Путляева
Большой бульвар, д. 30, стр. 1, г. Москва, Россия, 121205; lidia.mikhailova@mail.ru

Статья получена: 27.11.2023 **Статья принята к печати:** 11.12.2023 **Опубликована онлайн:** 17.12.2023

DOI: 10.24075/vrgmu.2023.048

GENETICALLY ENCODED LIGHT-INDUCIBLE SENSOR FOR NUCLEOLAR VISUALIZATION

Zhurlova PA, Besedovskaia ZV, Sokolinskaya EL, Putlyaeva LV ✉

Skolkovo institute of science and technology, Center for Molecular and Cellular Biology, Moscow, Russia

Nucleolus plays a vital role in enhancing rRNA production and maintaining ribosome biogenesis in tumor cells, making the nucleolus a desirable target for genetic and oncological research. The most convenient method for nucleolus monitoring is fluorescent microscopy, combining high efficiency and accessibility. Nevertheless, currently available fluorescent visualization methods are unsuitable for live-cell monitoring of nucleolus because they require continuous labeling. To address this issue, we have developed a genetically encoded Light-Activated Nucleolus Sensing (LANS) system for real-time nucleolar visualization. The combination of eMags domains and reader domain of DPF3 protein, responsible respectively for the light-induced dimerization and targeting the nucleolus, allowed LANS system to efficiently target nucleolus in several cancer cell lines without affecting cell morphology. This system makes it possible to increase the representation of the LANS2 sample in the nucleolus by 1.5 times relative to the fluorescence intensity values obtained before irradiation of the nucleolus. LANS holds the potential to accelerate the search for new drugs and enhance the primary screening of drug compounds in *in vivo* models.

Keywords: epigenetics, fluorescent proteins, eMags, optogenetics, nucleolus

Funding: this work was supported by the Russian Science Foundation grant № 22-24-01109.

✉ **Correspondence should be addressed:** Lidia V. Putlyaeva
Bolshoy Boulevard, 30, Moscow, Russia, 121205; lidia.mikhailova@mail.ru

Received: 27.11.2023 **Accepted:** 11.12.2023 **Published online:** 17.12.2023

DOI: 10.24075/brsmu.2023.048

Ядрышко представляет собой внутриядерный компартмент, играющий ключевую роль в регуляции клеточного цикла, биогенезе рибосом, активности теломеразы, метаболизме р53 и процессинге малых РНК. Тем не менее, основная роль ядрышка — биогенез рибосом — один из наиболее энергоемких и жестко регулируемых процессов в клетке [1]. Подавление транскрипции рРНК гена связано с уменьшением размера ядрышек, и, как следствие, с уменьшением скорости синтеза белка и роста клеток [2], [3]. В опухолевых клетках морфология ядрышка меняется, а именно происходит увеличение размеров и аномально стимулированных функций, изменение молекулярных путей таких супрессоров опухоли, как pRb, p53, c-Мус, циклин D1, NF-κB, ErbB3, BCL-2, RAD51 и BCL-2 [4–8]. Для терапии гематологических раковых заболеваний разрабатываются различные терапевтические стратегии [9–11], в основе которых лежит таргетное воздействие на ядрышко, включая использование селективных ингибиторов РНК Pol I, mTOR, АКТ и т. д. [9] при немелкоклеточном раке

легкого [12], раке почки, раке молочной железы, лимфоме [13] и др. Таким образом, мониторинг и визуализация ядрышка могут быть важны при разработке новых химиотерапевтических агентов, а также при изучении их потенциальных побочных эффектов.

Наиболее распространенным способом визуализации ядрышка является иммуофлуоресцентное окрашивание антителами, специфичными к ядрышковым белкам [14]. Основным недостатком данного метода является невозможность его использования для изучения динамических процессов в клетках. Удобным способом прижизненной визуализации ядрышек может быть флуоресцентная микроскопия из-за ее относительной простоты и возможности применения пространственно-временного анализа флуоресцентных изображений [15]. Недавно был разработан флуоресцентный зонд для одновременной визуализации митохондрий и ядрышек, содержащий два эмиссионных металлокомплекса на основе пирозола, связанного трифенилфосфином,

связанным с медью (C1 и C2) [16]. Другая группа создала аналогичный двойной флуоресцентный зонд, нацеленный на митохондрии и ядрышки. Синтезированная молекула основана на 9-(дициановинил)юлолидиноме (DCVJ) роторе и проявляла минимальную цитотоксичность [17].

Таким образом, все вышеперечисленные методы подходят для живой визуализации клетки, что важно для мониторинга клеточного ответа на различные стимулы. Ключевым недостатком таких методов является невозможность наблюдения за клетками в течение длительного времени, так как флуоресцентный краситель со временем разрушается и не передается дочерним клеткам. Для решения этой проблемы можно использовать генетически кодируемые флуоресцентные сенсоры, сочетающие в себе высокую гибкость, специфичность и подходящие для различных биологических систем. В большинстве случаев флуоресцентные биосенсоры малотоксичны и не мешают нормальным физиологическим процессам, что позволяет осуществлять мониторинг живых клеток в режиме реального времени. Еще одним преимуществом флуоресцентных анализов является то, что они требуют меньше времени, чем большинство анализов с фиксированными клетками [18]. Недавно была разработана оптогенетическая система для светоиндуцированного белок-белкового взаимодействия под названием enhanced Magnets (eMags) [19]. Данная система фотодимеризующихся белковых доменов создана на основе фоторецептора Vivid (VVD) из Нейроспоры густой (*Neurospora crassa*). Под воздействием синего света мономер VVD претерпевает конформационные изменения, что приводит к формированию димера, и следовательно, делает возможной обратимую светозависимую димеризацию изучаемых белков.

В данной работе описана новая генетически кодируемая система флуоресцентных сенсоров (light-activated nucleolus sensors, LANS) для визуализации ядрышка в реальном времени. LANS использует преимущества светозависимой димеризации системы eMags, что позволяет использовать данный сенсор для светоиндуцируемого рекрутирования целевых белков. Сенсоры LANS могут быть полезны для проведения биомедицинских исследований, а именно тестирования препаратов, оказывающих влияние на ядрышки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Молекулярное клонирование

Все плазмиды были созданы с использованием системы клонирования Голден Гейт (Golden Gate cloning system) [20] и набора векторов для клонирования MoClo Toolkit (AddGene Kit #1000000044). Последовательности eMagA и eMagB были взяты из статьи [19] и синтезированы фирмой «Клонинг Фасилити» (Москва, Россия) в векторе pAGM1301. Последовательность DPF3 была амплифицирована с использованием праймеров DPF3_CCAT_FOR gttGAAGA CatCCATggaacagtcattcccaataactactgtgacttctgcttgggggctc caacatgaacaagaagagtgggcgcc и DPF3_AATG_REV gttGA AGACatCATTGTGGCGACCGGTCCGGATCCGCCCGCCG CTtttgagcagttccag, добавляющих в последовательность сайт рестрикции BpI1, далее была клонирована в вектор pAGM1276. Для сборки итоговых плазмид eMagB-mScarlet и DPF3-mNeonGreen-eMagA использовалась технология MoClo и вектор pICH47732 согласно протоколу, описанному

в [20]. Для клонирования использовались рестриктазы BpI1 (BbsI) и Eco311 (BsaI) (Thermo Scientific, Waltham, MA; USA), и лигаза фага T4 (Евроген; Россия).

Ведение и трансфекция клеточной культуры

Клетки линии HEK293T культивировали при 37 °C (5% CO₂) в среде DMEM («ПанЭко»; Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (BioSera; Франция), 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина («ПанЭко»; Россия).

Для проведения трансфекции культуру клеток HEK293 растили в среде DMEM-full на 35 мм чашках Петри со стеклянным дном (SPL Life Sciences; Корея). Для трансфекции использовался реактив GenJect-39 («Молекта»; Россия) согласно инструкции производителя.

Флуоресцентная микроскопия живых клеток

При проведении экспериментов по визуализации живых клеток клетки культивировали в конфокальных чашках со стеклянным дном (SPL Life Sciences; Корея). Непосредственно перед микроскопией среда DMEM заменялась на среду для визуализации MEM («ПанЭко»; Россия) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (BioSera; Франция) и 20 мМ HEPES (Corning; NY, USA).

Для *in vivo* флуоресцентной микроскопии использовали флуоресцентный микроскоп Keyence Bioevo BZ-9000 (Keyence; Япония). Клетки снимали при увеличении 60x, используя объектив CFI Plan Apo λ60xH/NA1.40. Съемки вели в двух каналах: зеленом (фильтр-куб GFP-B, возбуждение 480/30 нм) для облучения клеток синим светом на протяжении 200 мс и красном (фильтр-куб Texas Red, возбуждение 560/40 нм, испускание 630/75 нм) для детекции флуоресценции eMagB-mScarlet.

Анализ изображений

Для расчета отношения флуоресценции ядрышко/цитоплазма во времени использовался инструмент «ROI Manager» программного обеспечения Fiji. Первый ROI устанавливался вручную в область ядрышка, второй ROI устанавливался в область цитоплазмы в той же клетке. Значения, соответствующие соотношению ядрышко/цитоплазма (интенсивность флуоресценции, рис. 1), были получены путем деления ROI 1 на ROI 2, а затем деления полученного значения на значение, соответствующее изображению ядра до облучения. График построен с помощью GraphPad Prism 8.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для визуализации ядрышка мы создали систему генетически кодируемых флуоресцентных сенсоров (LANS), представляющую собой пару фотодимеризующихся зондов LANS1 и LANS2. LANS1 включает в себя последовательность PHD-домена белка DPF3, слитую с зеленым флуоресцентным белком mNeonGreen, сигналом ядерной локализации (NLS) и последовательностью фотодомена eMagA (рис. 1А, верхняя панель). eMagA является частью светозависимой системы enhanced Magnets (eMags), созданной на основе фоторецептора Vivid (VVD) из Нейроспоры густой (*Neurospora crassa*) [19]. Парой к созданному сенсору LANS1 является плазида LANS2, экспрессирующая фотодомен eMagB, красный

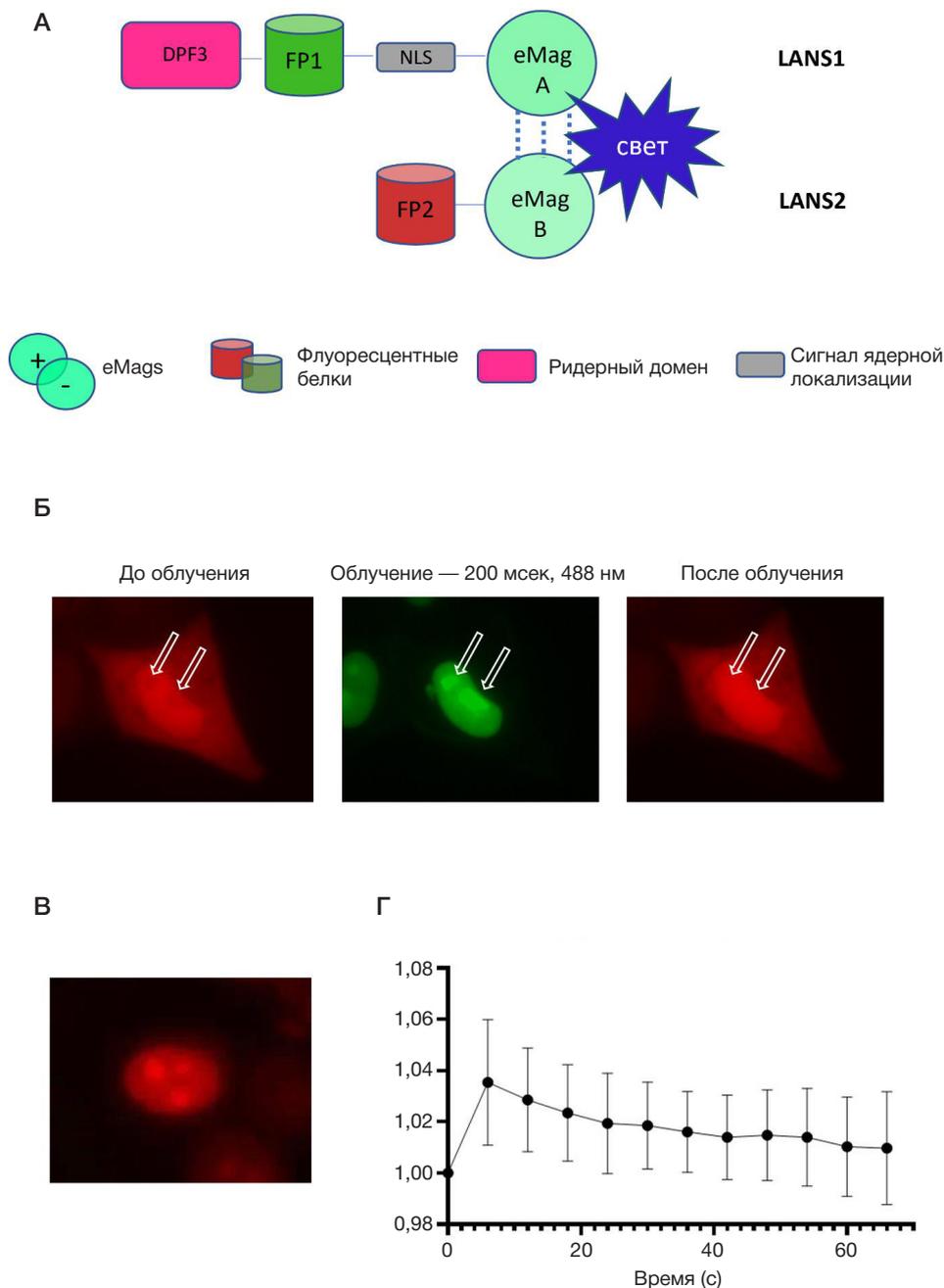


Рис. 1. Характеристика генно-инженерной системы сенсоров, обеспечивающей светозависимое рекрутирование eMagB-mScarlet в область ядрышек. **А.** Схематичное изображение светозависимой димеризации проб, задействованных в эксперименте. Белыми стрелками отмечена область ядрышек. **Б.** Репрезентативные изображения флуоресцентной микроскопии клеток HeLa, трансфицированных сенсорами eMagB-mScarlet и DPF3-mNeonGreen-eMagA до облучения синим светом (слева), на протяжении облучения (в середине) и после облучения (справа). **В.** Флуоресцентное изображения ядра клетки HEK293T, экспрессирующей DPF3-mScarlet. **Г.** График, отображающий отношение относительной флуоресценции ядрышко/цитоплазма к относительной флуоресценции до индукции на протяжении эксперимента (размер выборки $n = 33$)

флуоресцентный белок mScarlet (рис. 1А, нижняя панель). В свою очередь, DPF3 представляет собой домен, афинный к модификации гистона H3K4me1 в его димерном состоянии, однако в нашей лаборатории было экспериментально показано, что продукт сенсора на основе DPF3 в мономерной форме может накапливаться в ядрышке (рис. 1В). Одновременное использование в эксперименте молекулярных конструкций с DPF3-mNeonGreen-eMagA и mScarlet-eMagB позволило осуществить обратимую светозависимую гетеродимеризацию целевых белков при кратковременном облучении синим светом (рис. 1Б).

Чтобы доказать обратимость связывания LANS с ядрышком, мы сначала облучали клетки, экспрессирующие LANS, на протяжении 200 мс, а затем

инкубировали клетки в темноте. Подсчет относительного изменения флуоресценции до и после облучения показал, что транслокация пробы из ядрышек в нуклеоплазму происходит примерно в течение 60 с (рис. 1Г).

Таким образом, мы показали, что созданная система сенсоров LANS может быть использована для обратимой светозависимой визуализации ядрышкового компартамента клетки. Комбинация LANS1, имеющего сродство к белкам ядрышек, и LANS2, находящегося в цитоплазме, позволила рекрутировать LANS2 в ядрышковые области посредством облучения клетки короткими импульсами синего света. Сенсор LANS может быть использован для изучения динамики ядрышка и направленного транспорта целевой ДНК в ядрышко.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ядрышко представляет собой динамичный субъядерный компартмент, организованный посредством разделения фаз, участвующий в синтезе рибосомной РНК, процессинге и сборке рибонуклеопротеинов для биогенеза рибосом. Также изменения в структуре ядрышка могут быть связаны со старением и играть роль в развитии различных патологий человека, включая рак и нейродегенерацию [21]. На разработку систем доставки целевых белков в ядрышко с использованием оптогенетических технологий направлены усилия многочисленных лабораторий во всем мире [22]. Подобные системы основаны на использовании фоточувствительных белков, которые под воздействием света с определенной длиной волны претерпевают конформационные изменения и димеризуются, тем самым сближая целевые белки. Фотодимеризующиеся домены успешно используются исследователями для манипуляции различными клеточными процессами, такими как сигнальные пути [23], [24], транспорт клеточных органелл [25, 26], ядерно-цитоплазматический транспорт [27, 28], динамика цитоскелета [29], фазовая сепарация [30, 31].

Полученные в данной работе результаты, свидетельствующие о возможности осуществлять светоиндуцированный таргетинг в ядро, вполне согласуются с данными, полученными в других лабораториях. Например, фотоиндуцируемый сигнал ядерной локализации LINUS позволил исследователям транслоцировать белок mCherry

из цитоплазмы в ядро, увеличив его представленность в ядре примерно в 1,8 раза [32], в то время как созданная нами система LANS позволила увеличить представленность пробы LANS2 в ядрышке в 1,5 раза относительно значений интенсивности флуоресценции, полученных до облучения ядрышка. Таким образом, данная система сенсоров может быть полезна для светоиндуцируемого рекрутирования целевых белков в ядрышко.

ВЫВОДЫ

В данной работе описана принципиально новая генетически кодируемая светоиндуцируемая система сенсоров LANS с минимальным уровнем токсического воздействия на клетки, объединившая подходы по созданию генетически кодируемых сенсоров для картирования ядрышка с методом оптогенетики. Благодаря светозависимой гетеродимеризации фотодоменов eMagA и eMagB в составе системы сенсоров мы наблюдали перемещение пробы LANS2 из цитоплазмы и визуализацию ядрышкового компартмента клетки. Стоит отметить, что отношение интенсивности флуоресценции ядрышко/цитоплазма до и после облучения не очень высокое (рис. 1Г), что может быть объяснено слишком высоким уровнем экспрессии сенсоров LANS1 и LANS2 в данном эксперименте. Эта проблема может быть решена в дальнейшем путем подбора оптимальных концентраций сенсоров или созданием стабильной клеточной линии, экспрессирующей сенсоры.

Литература

- Engbrecht M, Mangerich A. The Nucleolus and PARP1 in Cancer Biology. *Cancers*. 2020; 12.
- Bersaglieri C, Santoro R. Genome Organization in and around the Nucleolus. *Cells*. 2019; 8.
- Weeks SE, Metge BJ, Samant RS. The nucleolus: a central response hub for the stressors that drive cancer progression. *Cell Mol Life Sci*. 2019; 76: 4511–24.
- Treré D, Ceccarelli C, Montanaro L, Tosti E, Derenzini M. Nucleolar size and activity are related to pRb and p53 status in human breast cancer. *J Histochem Cytochem*. 2004; 52: 1601–7.
- Russo A, Russo G. Ribosomal Proteins Control or Bypass p53 during Nucleolar Stress. *Int J Mol Sci*. 2017; 18.
- Peddibhotla S, Wei Z, Papineni R, Lam MH, Rosen JM, Zhang P. The DNA damage effector Chk1 kinase regulates Cdc14B nucleolar shuttling during cell cycle progression. *Cell Cycle*. 2011; 10: 671–9.
- Andrique L, Fauvin D, El Maassarani M, Colasson H, Vannier B, Séité P. ErbB3(80 kDa), a nuclear variant of the ErbB3 receptor, binds to the Cyclin D1 promoter to activate cell proliferation but is negatively controlled by p14ARF. *Cell Signal*. 2012; 24: 1074–85.
- Sasaki M, Kawahara K, Nishio M, Mimori K, Kogo R, Hamada K, et al. Regulation of the MDM2-P53 pathway and tumor growth by PICT1 via nucleolar RPL11. *Nat Med*. 2011; 17: 944–51.
- Carotenuto P, Pecoraro A, Palma G, Russo G, Russo A. Therapeutic Approaches Targeting Nucleolus in Cancer. *Cells*. 2019; 8.
- Bywater MJ, Poortinga G, Sanij E, Hein N, Peck A, Cullinane C, et al. Inhibition of RNA polymerase I as a therapeutic strategy to promote cancer-specific activation of p53. *Cancer Cell*. 2012; 22: 51–65.
- Quin JE, Devlin JR, Cameron D, Hannan KM, Pearson RB, Hannan RD. Targeting the nucleolus for cancer intervention. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1842: 802–16.
- Chan JC, Hannan KM, Riddell K, Ng PY, Peck A, Lee RS, et al. AKT promotes rRNA synthesis and cooperates with c-MYC to stimulate ribosome biogenesis in cancer. *Sci Signal*. 2011; 4: ra56.
- Wall M, Poortinga G, Stanley KL, Lindemann RK, Bots M, Chan CJ, et al. The mTORC1 inhibitor everolimus prevents and treats Eμ-Myc lymphoma by restoring oncogene-induced senescence. *Cancer Discov*. 2013; 3: 82–95.
- Stenström L, Mahdessian D, Gnann C, Cesnik AJ, Ouyang W, Leonetti MD, et al. Mapping the nucleolar proteome reveals a spatiotemporal organization related to intrinsic protein disorder. *Mol Syst Biol*. 2020; 16: e9469.
- Farhy C, Hariharan S, Ylanko J, Orozco L, Zeng F-Y, Pass I, et al. Improving drug discovery using image-based multiparametric analysis of the epigenetic landscape. *Elife*. 2019; 8.
- Mayank, Rani R, Singh A, Garg N, Kaur N, Singh N. Mitochondria- and nucleolus-targeted copper(I) complexes with pyrazole-linked triphenylphosphine moieties for live cell imaging. *Analyst*. 2019; 145: 83–90.
- Mukherjee T, Soppina V, Ludovic R, Mély Y, Klymchenko AS, Collot M, et al. Live-cell imaging of the nucleolus and mapping mitochondrial viscosity with a dual function fluorescent probe. *Org Biomol Chem*. 2021; 19: 3389–95.
- Martin RM, Herce HD, Ludwig AK, Cardoso MC. Visualization of the Nucleolus in Living Cells with Cell-Penetrating Fluorescent Peptides. *Methods Mol Biol*. 2016; 1455: 71–82.
- Benedetti L, Marvin JS, Falahati H, Guillén-Samander A, Looger LL, De Camilli P. Optimized Vivid-derived Magnets photodimerizers for subcellular optogenetics in mammalian cells. *Elife*. 2020; 9.
- Werner S, Engler C, Weber E, Gruetzner R, Marillonnet S. Fast track assembly of multigene constructs using Golden Gate cloning and the MoClo system. *Bioeng Bugs*. 2012; 3: 38–43.
- Corman A, Sirozh O, Lafarga V, Fernandez-Capetillo O. Targeting the nucleolus as a therapeutic strategy in human disease. *Trends Biochem Sci*. 2023; 48: 274–87.
- Tan P, Hong T, Cai X, Li W, Huang Y, He L, et al. Optical control of protein delivery and partitioning in the nucleolus. *Nucleic Acids Res*. 2022; 50: e69.
- Gray NW, Weimer RM, Bureau I, Svoboda K. Rapid redistribution of synaptic PSD-95 in the neocortex in vivo. *PLoS Biol*. 2006; 4: e370.

24. Grusch M, Schelch K, Riedler R, Reichhart E, Differ C, Berger W, et al. Spatio-temporally precise activation of engineered receptor tyrosine kinases by light. *EMBO J.* 2014; 33: 1713–26.
25. van Bergeijk P, Adrian M, Hoogenraad CC, Kapitein LC. Optogenetic control of organelle transport and positioning. *Nature.* 2015; 518: 111–4.
26. Duan L, Che D, Zhang K, Ong Q, Guo S, Cui B. Optogenetic control of molecular motors and organelle distributions in cells. *Chem Biol.* 2015; 22: 671–82.
27. Lerner AM, Yumerefendi H, Goudy OJ, Strahl BD, Kuhlman B. Engineering Improved Photoswitches for the Control of Nucleocytoplasmic Distribution. *ACS Synth Biol.* 2018; 7: 2898–907.
28. Niopek D, Wehler P, Roensch J, Eils R, Di Ventura B. Optogenetic control of nuclear protein export. *Nat Commun.* 2016; 7: 10624.
29. van Haren J, Charafeddine RA, Ettinger A, Wang H, Hahn KM, Wittmann T. Local control of intracellular microtubule dynamics by EB1 photodissociation. *Nat Cell Biol.* 2018; 20: 252–61.
30. Shin Y, Berry J, Pannucci N, Haataja MP, Toettcher JE, Brangwynne CP. Spatiotemporal Control of Intracellular Phase Transitions Using Light-Activated optoDroplets. *Cell.* 2017; 168: 159–71.e14.
31. Dine E, Gil AA, Uribe G, Brangwynne CP, Toettcher JE. Protein Phase Separation Provides Long-Term Memory of Transient Spatial Stimuli. *Cell Syst.* 2018; 6: 655–63.e5.
32. Niopek D, Benzinger D, Roensch J, Draebing T, Wehler P, Eils R, et al. Engineering light-inducible nuclear localization signals for precise spatiotemporal control of protein dynamics in living cells. *Nat Commun.* 2014; 5: 4404.

References

1. Engbrecht M, Mangerich A. The Nucleolus and PARP1 in Cancer Biology. *Cancers.* 2020; 12.
2. Bersaglieri C, Santoro R. Genome Organization in and around the Nucleolus. *Cells.* 2019; 8.
3. Weeks SE, Metge BJ, Samant RS. The nucleolus: a central response hub for the stressors that drive cancer progression. *Cell Mol Life Sci.* 2019; 76: 4511–24.
4. Treré D, Ceccarelli C, Montanaro L, Tosti E, Derenzini M. Nucleolar size and activity are related to pRb and p53 status in human breast cancer. *J Histochem Cytochem.* 2004; 52: 1601–7.
5. Russo A, Russo G. Ribosomal Proteins Control or Bypass p53 during Nucleolar Stress. *Int J Mol Sci.* 2017; 18.
6. Peddibhotla S, Wei Z, Papineni R, Lam MH, Rosen JM, Zhang P. The DNA damage effector Chk1 kinase regulates Cdc14B nucleolar shuttling during cell cycle progression. *Cell Cycle.* 2011; 10: 671–9.
7. Andrique L, Fauvin D, El Maassarani M, Colasson H, Vannier B, Séité P. ErbB3(80 kDa), a nuclear variant of the ErbB3 receptor, binds to the Cyclin D1 promoter to activate cell proliferation but is negatively controlled by p14ARF. *Cell Signal.* 2012; 24: 1074–85.
8. Sasaki M, Kawahara K, Nishio M, Mimori K, Kogo R, Hamada K, et al. Regulation of the MDM2-P53 pathway and tumor growth by PICT1 via nucleolar RPL11. *Nat Med.* 2011; 17: 944–51.
9. Carotenuto P, Pecoraro A, Palma G, Russo G, Russo A. Therapeutic Approaches Targeting Nucleolus in Cancer. *Cells.* 2019; 8.
10. Bywater MJ, Poortinga G, Sanij E, Hein N, Peck A, Cullinane C, et al. Inhibition of RNA polymerase I as a therapeutic strategy to promote cancer-specific activation of p53. *Cancer Cell.* 2012; 22: 51–65.
11. Quin JE, Devlin JR, Cameron D, Hannan KM, Pearson RB, Hannan RD. Targeting the nucleolus for cancer intervention. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1842: 802–16.
12. Chan JC, Hannan KM, Riddell K, Ng PY, Peck A, Lee RS, et al. AKT promotes rRNA synthesis and cooperates with c-MYC to stimulate ribosome biogenesis in cancer. *Sci Signal.* 2011; 4: ra56.
13. Wall M, Poortinga G, Stanley KL, Lindemann RK, Bots M, Chan CJ, et al. The mTORC1 inhibitor everolimus prevents and treats Eμ-Myc lymphoma by restoring oncogene-induced senescence. *Cancer Discov.* 2013; 3: 82–95.
14. Stenström L, Mahdessian D, Gnann C, Cesnik AJ, Ouyang W, Leonetti MD, et al. Mapping the nucleolar proteome reveals a spatiotemporal organization related to intrinsic protein disorder. *Mol Syst Biol.* 2020; 16: e9469.
15. Farhy C, Hariharan S, Ylanko J, Orozco L, Zeng F-Y, Pass I, et al. Improving drug discovery using image-based multiparametric analysis of the epigenetic landscape. *Elife.* 2019; 8.
16. Mayank, Rani R, Singh A, Garg N, Kaur N, Singh N. Mitochondria- and nucleolus-targeted copper(II) complexes with pyrazole-linked triphenylphosphine moieties for live cell imaging. *Analyst.* 2019; 145: 83–90.
17. Mukherjee T, Soppina V, Ludovic R, Mély Y, Klymchenko AS, Collot M, et al. Live-cell imaging of the nucleolus and mapping mitochondrial viscosity with a dual function fluorescent probe. *Org Biomol Chem.* 2021; 19: 3389–95.
18. Martin RM, Herce HD, Ludwig AK, Cardoso MC. Visualization of the Nucleolus in Living Cells with Cell-Penetrating Fluorescent Peptides. *Methods Mol Biol.* 2016; 1455: 71–82.
19. Benedetti L, Marvin JS, Falahati H, Guillén-Samander A, Looger LL, De Camilli P. Optimized Vivid-derived Magnets photodimerizers for subcellular optogenetics in mammalian cells. *Elife.* 2020; 9.
20. Werner S, Engler C, Weber E, Gruetzner R, Marillonnet S. Fast track assembly of multigene constructs using Golden Gate cloning and the MoClo system. *Bioeng Bugs.* 2012; 3: 38–43.
21. Corman A, Sirozh O, Lafarga V, Fernandez-Capetillo O. Targeting the nucleolus as a therapeutic strategy in human disease. *Trends Biochem Sci.* 2023; 48: 274–87.
22. Tan P, Hong T, Cai X, Li W, Huang Y, He L, et al. Optical control of protein delivery and partitioning in the nucleolus. *Nucleic Acids Res.* 2022; 50: e69.
23. Gray NW, Weimer RM, Bureau I, Svoboda K. Rapid redistribution of synaptic PSD-95 in the neocortex in vivo. *PLoS Biol.* 2006; 4: e370.
24. Grusch M, Schelch K, Riedler R, Reichhart E, Differ C, Berger W, et al. Spatio-temporally precise activation of engineered receptor tyrosine kinases by light. *EMBO J.* 2014; 33: 1713–26.
25. van Bergeijk P, Adrian M, Hoogenraad CC, Kapitein LC. Optogenetic control of organelle transport and positioning. *Nature.* 2015; 518: 111–4.
26. Duan L, Che D, Zhang K, Ong Q, Guo S, Cui B. Optogenetic control of molecular motors and organelle distributions in cells. *Chem Biol.* 2015; 22: 671–82.
27. Lerner AM, Yumerefendi H, Goudy OJ, Strahl BD, Kuhlman B. Engineering Improved Photoswitches for the Control of Nucleocytoplasmic Distribution. *ACS Synth Biol.* 2018; 7: 2898–907.
28. Niopek D, Wehler P, Roensch J, Eils R, Di Ventura B. Optogenetic control of nuclear protein export. *Nat Commun.* 2016; 7: 10624.
29. van Haren J, Charafeddine RA, Ettinger A, Wang H, Hahn KM, Wittmann T. Local control of intracellular microtubule dynamics by EB1 photodissociation. *Nat Cell Biol.* 2018; 20: 252–61.
30. Shin Y, Berry J, Pannucci N, Haataja MP, Toettcher JE, Brangwynne CP. Spatiotemporal Control of Intracellular Phase Transitions Using Light-Activated optoDroplets. *Cell.* 2017; 168: 159–71.e14.
31. Dine E, Gil AA, Uribe G, Brangwynne CP, Toettcher JE. Protein Phase Separation Provides Long-Term Memory of Transient Spatial Stimuli. *Cell Syst.* 2018; 6: 655–63.e5.
32. Niopek D, Benzinger D, Roensch J, Draebing T, Wehler P, Eils R, et al. Engineering light-inducible nuclear localization signals for precise spatiotemporal control of protein dynamics in living cells. *Nat Commun.* 2014; 5: 4404.