Applied Molecular Biology
Vol.1, issu.1, Winter. 2023

CRISPR-Based Diagnosis and Treatment of Human Cytomegalovirus (HCMV) Infection

* **Fatemeh Abdi Vazvani**
** **Fatemeh Akbarian**

Abstract

Human cytomegalovirus is the largest and most prevalent member of the human herpes virus family. The only natural host of this virus are humen, with a worldwide outbreak. According to the health, economic, and social circumstances in various societies, 80 percent of adults typically have antibodies against the cytomegalovirus. This infection is asymptomatic and spreads in the environment by disseminating the virus from the infected person after the infection. As a result, there is a significant chance of infection and widespread diffusion of this virus. The purpose of this investigation is to utilize cutting-edge CRISPR genome editing technology to gather data on the life cycle, infectiousness, genetics, diagnosis, and therapy of this virus. Human cytomegalovirus, therapy, genome editing, and infectivity were used as keywords in the NCBI and PubMed databases to find the data for this study. These databases eventually yielded 80 articles, among which 42 were selected based on the criteria outlined in this article. The study of the preceding cases has demonstrated the effective use of the CRISPR tool with the Sherlock technique in the clinical diagnosis of this virus. Therefore, the use of this technology is

*MSc. Student, Genetics Group, Department of Basic Sciences, Ale-Taha Institute of Higher Education, Tehran, Iran.
**Assistant Professor, Genetics Group, Department of Basic Sciences, Ale-Taha Institute of Higher Education, Tehran, Iran (Corresponding Author).
E-mail: F.akbarian1@gmail.com

recommended to doctor and professionals for rapid and cost-effective diagnosis and treatment, being aware of its risks and challenges.

Keywords: Human Cytomegalovirus(HCMV), Treatment, Gene Editing, Diagnosis, Infectivity, CRISPR/Cas, SHERLOCK

زیست شناسی مولکولی کاربردی
سال اول/ شماره ۱/ زمستان ۱۴۰۱

تشخیص و درمان سایتومگالوویروس انسانی بر مبنای تکنولوژی کریسپر

***فاطمه عبدی وزوانی**
****فاطمه اکبریان**

چکیده

سایتومگالوویروس انسانی بزرگ‌ترین و شایع‌ترین عضو خانواده هرپس ویروس‌های انسانی محسوب می‌شود. این ویروس شیوع جهانی داشته و انسان تنها میزبان طبیعی آن می‌باشد. به طور کلی در ۸۰ درصد از بالغان آنتی‌بادی ضد ویروس سایتومگال وجود دارد که این بر حسب وضعیت بهداشتی، اقتصادی و اجتماعی در جوامع مختلف، متفاوت است. عفونت با سایتومگال بدون علامت است و بعد از آلودگی با دفع ویروس از شخص مبتلا، در محیط منتشر می‌شود؛ لذا این ویروس انتشار گسترده و احتمال عفونت‌زایی بالایی دارد. هدف از این مطالعه، گردآوری اطلاعاتی مبنی بر چرخه مولکولی عفونت‌زایی، ژنتیک ویروس، تشخیص و درمان این ویروس با استفاده از تکنولوژی نوین ویرایش ژنوم کریسپر می‌باشد. اطلاعات موجود در این مطالعه از پایگاه داده‌های NCBI و PubMed با استفاده از کلمات کلیدی ویروس سایتومگال انسانی، درمان، ویرایش ژنوم و عفونت‌زایی گردآوری شده است. درنتیجه ۸۰ مقاله توسط این پایگاه داده‌ها به دست آمد که ۴۲ مقاله با توجه به معیارهای مورد بحث در این نوشتار انتخاب شدند. مطالعه موارد ذکرشده بیانگر به‌کارگیری عظیم ابزار کریسپر با تکنیک شرلوک در تشخیص بالینی این ویروس بوده است؛ لذا استفاده از این تکنیک با درنظرگرفتن خطرات و چالش‌های آن به پزشکان و متخصصان جهت تشخیص و درمان سریع و کم‌هزینه پیشنهاد می‌گردد.

واژگان کلیدی: ویروس سایتومگال انسانی (HCMV)، درمان، عفونت‌زایی، ویرایش ژنوم، تشخیص، CRISPR/Cas, SHERLOCK.

---

* دانشجوی کارشناسی ارشد گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، مؤسسه آموزش عالی آل طه، تهران، ایران.

** استادیار گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، مؤسسه آموزش عالی آل طه، تهران، ایران (نویسنده مسئول). f.akbarian1@gmail.com

مقدمه

سایتومگال انسانی یک ویروس DNAدار دورشته‌ای با ژنومی نزدیک به ۲۴۰ کیلوباز می‌باشد [۱]. با توجه به گزارش‌های مرکز کنترل و پیشگیری از بیماری‌ها (CDC= Centers for Disease Control and Prevention) و سازمان بهداشت جهانی (WHO= World Health Organization)، ویروس سایتومگال انسانی می‌تواند افرادی را در هر رده سنی مبتلا کند. اگرچه عفونت CMV معمولاً بدون علامت است؛ اما می تواند منجر به پیامدهای شدیدی در افراد دارای نقص ایمنی، افراد دارای پیوند عضو و بیماران نیازمند به تزریق خون شود [۲, ۳].

CMV پس از عفونت اولیه می‌تواند در غدد بزاقی، کلیه‌ها، کبد و لنفوسیت‌ها جایگزین شده و منجر به ایجاد عفونت مزمن گردد. این ویروس می‌تواند از طریق ادرار، بزاق، منی، ترشحات گردن رحم و شیر دفع شود؛ اما به طور کلی بزاق و ادرار منابع اصلی انتشار ویروس می‌باشد. مهم‌ترین راه انتقال این ویروس، مسیرهای دهانی و تنفسی است؛ اما از طریق جفت، تزریق خون، پیوند اعضا و تماس جنسی هم امکان انتقال وجود دارد [٤]. عفونت با CMV در افراد طبیعی بالای ۷ سال و افراد بالغ باعث ایجاد سندرمی مشابه به منونوکلئوز (Mononucleosis) عفونی می‌گردد. در این بیماری اختلال‌های عملکرد کبد، تب، دردهای عضلانی و لنفوسیتوز با افزایش در تعداد لنفوسیت‌های آتیپیک (Atypic Lymphocytes) وجود دارد؛ اما از نظر وجود آنتی‌بادی-های هتروفیل منفی است که این مورد سبب افتراق این بیماری با منونوکلئوز ناشی از ویروس اپشتن بار (EBV) می‌گردد [٤].

از آنجایی که HCMV می‌تواند علائم مختلفی را نشان دهد، متخصصان برای تشخیص بموقع و درست این ویروس، با چالش‌های قابل توجهی مواجه‌اند [۵]. همچنین این ویروس نهفته پایدار، قادر به گریز از سیستم ایمنی بدن می‌باشد و لذا عفونت ناشی از آن به عنوان یک بحران بهداشتی در جمعیت‌های پرخطر محسوب می‌شود [۲].

۱) شیوع ویروس سایتومگال انسانی

ویروس سایتومگال انسانی در جهان بسیار شایع است؛ به طوری که شیوع ۱۰۰ درصدی در آفریقا و آسیا و ۸۰ درصدی در اروپا و آمریکای شمالی گزارش شده است [٦]. سایتومگالوویروس قادر است افراد در هر رده سنی را مبتلا کند [۷]. در آمریکا بیش از ۵۰ درصد بزرگسالان در ٤۰ سالگی و تقریباً یک سوم کودکان در ۵ سالگی به ویروس سایتومگال آلوده می‌شوند [۷]. میزان مرگ و میر مشاهده‌شده در نوزادان مبتلا به این ویروس حدودا ۳۰ درصد می‌باشد [٤]. عفونت با این ویروس در ۲ گروه افراد بسیار اهمیت دارد:

الف) نوزادان: از آنجا که HCMV طی بارداری قابلیت عبور از جفت را دارد، می‌تواند طی عود ویروس نهفته موجود در بدن مادر، از جفت عبور کرده و عفونت‌های شدیدی را در بدن جنین ایجاد کند. عفونت‌های مادرزادی ممکن است باعث مرگ جنین در داخل رحم شده یا ابتلا به بیماری اجسام سیتومگالیک نوزادان (CMID: Cytomegalic Inclusion disease of the newborn) تازه‌متولدشده را ایجاد کند. در این نوزادان سیستم اعصاب مرکزی و سیستم رتیکولواندوتلیال به‌شدت درگیر شده و علائمی مانند خون‌ریزی، اختلالات بینایی، کاهش شنوایی، آسیب کبدی و میکروسفالی مشاهده می‌شود؛ همچنین بعضی نوزادان هنگام زایمان و عبور از کانال زایمان، دچار عفونت می‌شوند.

ب) بیماران مبتلا به نقص ایمنی: CMV در گیرندگان پیوند کلیه، قلب، ریه و کبد منجر به ایجاد عوارض و علائم متعددی می‌شود که از مهم‌ترین آن می‌توان به تب، لکوپنی، هپاتیت، گاستریت و کولیت اشاره کرد. شایع‌ترین عارضه در این بیماران پنومونی است [٤].

۲) چرخه مولکولی عفونت‌زایی سایتومگال انسانی

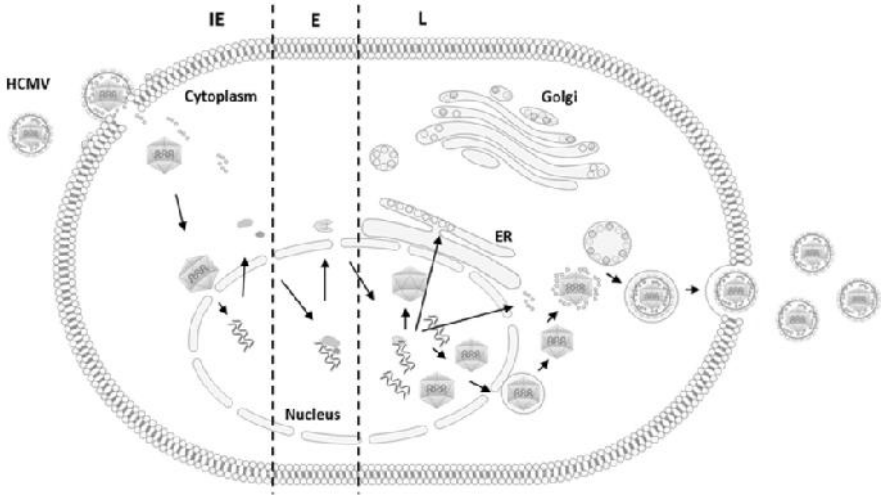
مشکلات اجتماعی ناشی از سایتومگالوویروس، انگیزه‌ای را برای بررسی و مطالعه

چرخه زندگی و عفونت‌زایی پیچیده آن ایجاد می‌کند. ژنوم ویروس سایتومگال انسانی دارای ۱۹۲ قاب خوانش باز می‌باشد که توان بیان پروتئین‌های عملکردی را دارد و به عنوان بزرگ‌ترین ژنوم در میان دیگر ویروس‌های هرپس شناخته شده‌است [۸]. پتانسیل کدگذاری این ویروس گسترش بیشتری یافته و سطح بالایی از پیچیدگی ژنوم را نشان می‌دهد [۹]. تعاملات پویای ویروس و میزبان باعث تغییر عملکرد سلولی می‌شود و برای تکثیر و انتشار ویروس مورد نیاز است [۱۰]. گلیکوپروتین‌های پوششی ویروسی که در قسمت خارجی ذره عفونی قرار دارند، در حین ورود با گیرنده‌های سلول میزبان تعامل می‌کنند تا از طریق ادغام با غشای سلول میزبان یا اندوسیتوز وارد سلول میزبان شوند. پروتئین‌های ویروسی به کپسید متصل شده و با میکروتوبول‌های میزبان برای انتقال کپسیدهای ویروسی به پوشش هسته و درون هسته تعامل می‌کنند [۱۱–۱۳]. دراین زمان، سایر پروتئین‌های داخل سلول در سلول‌های آلوده به وسیله ذرات عفونی رسوب می‌کنند و مکان‌های مختلف داخل سلول را هدف می‌گیرند تا شروع پاسخ ایمنی را مهار و بیان ژن ویروسی را تنظیم کنند [۱۴–۱۶]. علاوه بر این بسیاری از پروتئین‌های کدگذاری‌شده با ویروس، مسیرهای سیگنال‌دهی و متابولیسم سلولی را تنظیم می‌کنند که باعث حمایت از همانندسازی ویروس و فرار از سیستم ایمنی می‌شود [۱۷, ۱۸]. بیان این پروتین‌های ویروسی به صورت آبشاری بوده، به چند کلاس زمانی IE (Immediate Early)، DE (Delayed Early) و L (Late) تقسیم می‌شود که هر کدام جنبه‌های مختلف چرخه عفونی را تنظیم می‌کنند [۱۹, ۲۰]. کپسیدها در هسته جمع شده و خروج آنها از هسته از طریق اختلال در غشای دولایه هسته و لامین هسته‌ای است [۲۱, ۲۲]. هنگامی که کپسید به سیتوپلاسم می‌رسد، ادغام و انتقال ذرات ویروسی از طریق همکاری چند مسیر سلولی اتفاق می‌افتد [۲۳]. مسیر ترشحی سلول شامل شبکه آندوپلاسمی، دستگاه گلژی و اندوزوم‌ها، برای تشکیل یک مجموعه ویروسی سیتوپلاسمی پیچیده مورد استفاده قرار می‌گیرد [۲۴, ۲۵]. در این مجموعه، کپسید، لایه پوششی و پوشش ویروسی را از وزیکول‌های داخل سلولی به دست می

آورد. در مرحله بعد، ذرات عفونی تولیدشده به همراه سایر ذرات غیر عفونی، به نام اجسام متراکم، به فضای خارج سلولی فرستاده می‌شوند (شکل ۱).

در سال‌های اخیر، مطالعات پروتئومی کمک قابل توجهی به درک زیست‌شناسی ویروس سایتومگال انسانی کرده است. ادغام رویکردهای پروتئومی با ویروس‌شناسی مولکولی، مطالعات میکروسکوپی و تکنیک‌های بیوشیمیایی توانسته است مراحل مختلف چرخه زندگی سایتومگالوویروس را در سطحی که قبلاً دست‌یافتنی نبود، توصیف کند [۲۶].

.



شکل۱. چرخه مولکولی عفونت‌زایی ویروس سایتومگال انسانی. شکل فوق برگرفته از مقاله [۴۳] می‌باشد.

۳) تشخیص بر مبنای تکنولوژی کریسپر

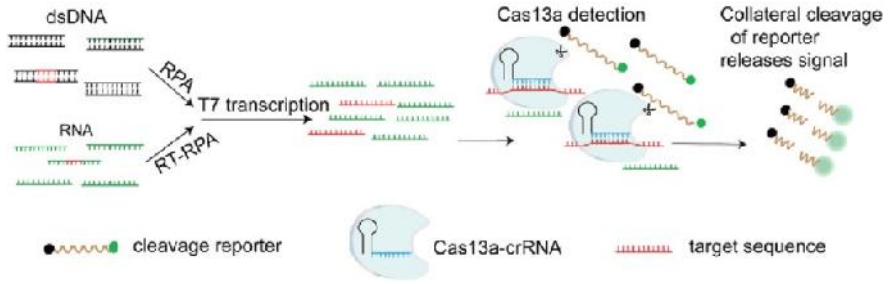
توالی‌های کوتاه پالیندرومی فاصله‌دار خوشه‌ای منظم (CRISPR= Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)، به عنوان بخشی از توالی‌های DNA در ژنوم پروکاریوت‌ها می‌توانند ایمنی اکتسابی را برای باکتری فراهم کنند. این توالی‌ها درواقع قسمتی از ژنوم ویروس‌های باکتریوفاژ بوده‌اند که باکتری آنها را در

ژنوم خود ذخیره کرده و در صورت برخورد مجدد با همان باکتریوفاژ، از این سیستم برای تشخیص مجدد باکتریوفاژ استفاده می‌کنند. در ادامه باکتری با رونویسی از این قطعه DNA خاص، یک توالی پالیندرومی از جنس RNA راهنما (gRNA: Guide RNA) ایجاد می‌کند که می‌تواند مکمل خود را در ژنوم باکتریوفاژ شناسایی کرده، به آن متصل شود. بخش دیگر این سیستم دفاعی، یک آنزیم برش‌دهنده DNA متصل به کریسپر به اسم Cas است که به gRNA کریسپر متصل می‌شود و پس از متصل‌شدن RNA به DNA ویروسی، آن را برش زده، باکتریوفاژ را غیر فعال می‌کند [۲۷]. نام‌گذاری اولیه ژن‌های Cas بر اساس مشابهت و فراوانی بالا صورت گرفته و به چهار دسته Cas1, Cas2, Cas3, Cas4 تقسیم شدند [۲۸]. در سال‌های اخیر، طبقه‌بندی سیستم‌های CRISPR/Cas پیشرفت و تغییرات چشمگیری داشته است؛ به طوری که طبقه‌بندی جدید در ۲ کلاس اصلی، ٦ گروه و ٤٨ زیرگروه تقسیم می‌شود [۲۹].

گسترده‌ترین حوزه مورد بررسی سیستم‌های تشخیصی کریسپر، تشخیص عفونت‌های ویروسی است. چندین محقق روش‌هایی را بر اساس خانواده‌های Cas13a و CRISPR/Cas12a توسعه داده‌اند که به‌ترتیب SHERLOCK (Specific High-Sensitivity Enzymatic Reporter un-Locking) و DETECTR (DNA Endonuclease-targeted CRISPR Trans Reporter) نامیده می‌شوند. روش DETECTR از آنزیم‌های گروه ٤ و زیرگروه Cas12a استفاده می‌کند و روش SHERLOCK از آنزیم‌های گروه ٥ و زیرگروه Cas13a استفاده می‌کند [۳۰-۳۲]. ویروس‌های DNAدار مثل هرپس ویروس‌ها شامل CMV و EBV با روش کریسپر شناسایی می‌شوند. در محیط بالینی شناسایی ویروس سایتومگال انسانی به وسیله تکنیک SHERLOCK صورت می‌گیرد [۳۳, ۳٤].

فناوری SHERLOCK و DETECTR روش بالقوه‌ای برای تشخیص و شناسایی سریع بیماری‌های عفونی با آزمایش‌های فوق حساس است که نیاز به پردازش و تجهیزات پیچیده ندارد. این تکنیک با این مکانیسم به تشخیص ویروس سایتومگال

انسانی می‌پردازد. واکنش SHERLOCK، از طریق پیش تقویت DNA (Preamplification) با یک ریکامبیناز RPA یا پیش‌تقویت RNA (Recombinase Polymerase amplification) با رونویسی معکوس RPA (Reverse – transcriptase RPA) و سپس تشخیص و فعال‌شدن آنزیم Cas13a انجام می‌شود. در طول پیش‌تکثیر، پروموتورهای T7 RNA پلیمراز اضافه می‌شوند تا امکان رونویسی از DNA تقویت‌شده به RNA را فراهم کند. سپس این RNA را می‌توان از طریق انکوباسیون با Cas13a، روابط مکملی RNA با کریسپر و حسگرهای RNA فلورسنت شناسایی کرد. با اتصال یک توالی RNA هدف، آنزیم Cas13a فعال شده و سایر گونه‌های RNA را در محلول از هم باز می‌کند. این پدیده به عنوان اثر برش جانبی (Collateral Cleavage) شناخته می‌شود. حسگرهای RNA با یک مولکول فلورسنت گزارشگر (Reporter) در انتهای ۵ پریم و یک مولکول خاموش‌کننده (Quencher) در انتهای ۳ پریم توسط Cas13a فعال شده و پس از شکافته‌شدن یک سیگنال فلورسنت ایجاد می‌شود [۳۵] (شکل ۲). در غیاب فعال‌سازی توسط Cas13، برش RNA گزارشگر، تولید فلورسنت و درنتیجه تشخیص عامل ویروسی امکان‌پذیر نیست [۳۵] (شکل ۲). فناوری کریسپر به دانشمندان اجازه می‌دهد با روشی مشابه، با تغییر RNA الگو و استفاده از یک پروتئین متصل به کریسپر موسوم به Cas، تغییراتی در DNA سلول مورد نظر اعمال کند [۲۷].



شکل۲. مکانیسم تشخیص ویروس بر مبنای SHERLOCK، شکل برگرفته از مقاله [٤٤] می‌باشد.

٤) درمان بر مبنای تکنولوژی کریسپر

عفونت‌های ویروسی در ۳ حالت متمایز مشاهده می‌شوند:

۱. عفونت لیتیک: ویروس به طور فعال در حال تکثیر و تولید ویروس است و پس از بسته‌بندی ژنوم ویروسی در پوشش‌های پروتینی یا کپسیدها، از طریق لیز سلولی آزاد می‌شوند و درنتیجه سلول میزبان را از بین می‌برند [۳٦].

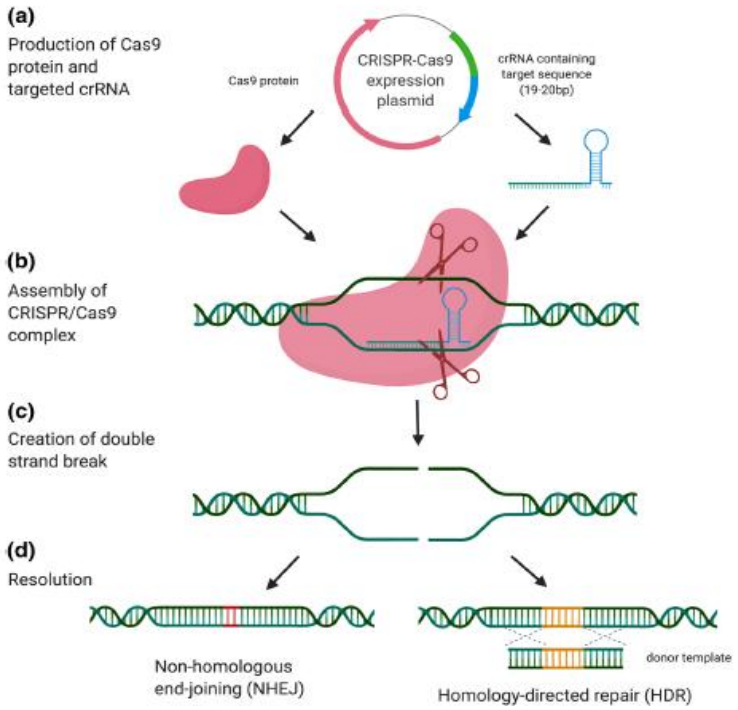
۲. عفونت نهفته: که در آن، ویروس وارد یک حالت خفته می‌شود که می‌تواند سال‌ها در آن باقی بماند. بسیاری از پاتوژن‌های مهم انسانی از جمله سایتومگالوویروس باعث عفونت نهفته می‌شوند [۳۷].

۳. عفونت مزمن: تکثیر مداوم ویروس در سطح پایین که منجر به آسیب مزمن اندام می‌شود [۳۸].

در عفونت ویروسی نهفته و مزمن، ژنوم ویروسی به طور نامحدود در داخل سلول میزبان نگهداری می‌شود یا در ژنوم میزبان ادغام می‌شود. هنگامی که ویروس در داخل سلول میزبان ساکن شد، درمان آن بسیار چالش‌برانگیز است [۳۹]. پیشرفت‌های اخیر در تکنیک‌های ویرایش ژن به‌خصوص CRISPR/Cas9 امکان ایجاد تغییرات دقیق در طیف گسترده‌ای از ژنوم، از جمله ویروس‌های DNAدار فراهم کرده است [٤۰]. هدف روش کریسپر بر بیان مشترک یک نوکلئاز Cas9 پروکاریوتی و یک توالی RNA راهنما است. هنگامی که هدف‌گیری gRNA توسط Cas9 دچار شکست ۲رشته‌ای (=DBS Double-Stranded Break) می‌شود، دو فرایند اصلی ترمیم آسیب با هم رقابت کرده و باعث تغییراتی در توالی اصلی می‌شوند. اتصال انتهای غیرهمولوگ (NHEJ= Non-homologous end-joining) یک فرایند مستعد خطاست که در آن جفت بازها اغلب قبل از اینکه دو انتها به هم متصل شوند، به دنباله آسیب‌دیده اضافه یا کم می‌شوند و به طور قابل توجهی باعث جهش‌های (INDEL= Insertion and deletion) می‌شوند. نوترکیبی همولوگ (HR= Homologous Recombination) نیز توالی را با استفاده از بخش‌هایی از DNA همولوگ به عنوان الگو ترمیم می‌کند که وقتی با ساختار DNA

اگزوژن جفت می‌شود، امکان ایجاد تغییرات دقیق در ژنوم هدف را فراهم می‌کند [٤١] (شکل ۳).

در ادامه به بررسی کارایی و امکان‌سنجی استفاده از تکنیک‌های مبتنی بر کریسپر برای مهندسی ژنوم HCMV می‌پردازیم. روش‌های مبتنی بر کریسپر برای هدف‌گیری موثر توالی‌های ژن سایتومگالوویروس از طریق جهش INDEL و نوترکیبی همولوگ استفاده می‌شوند. پس از ارزیابی پارامترهای تجربی مختلف، متوجه شدیم که جهش‌های INDEL با واسطه NHEJ می‌توانند منجر به حذف بیش از ۷۵ درصد ژن شوند؛ در حالی که جهش‌های هدف‌گیری‌شده توسط HR می‌توانند به نوترکیبی بیش از ٤٠ درصد برسند. درمجموع این نتایج زمینه را برای استفاده از کریسپر در فیبروبلاست‌های اولیه جهت ایجاد تغییرات خاص در ژنوم سیتومگالوویروس، ساده‌سازی تولید ویریون‌های جهش یافته و تسهیل بررسی فرایندهای مهم برای تکثیر HCMV فراهم می‌کند [٤٢]. با این حال، سیستم‌های مبتنی بر کریسپر می‌توانند برای هدف‌قراردادن ژنوم‌های ویروسی در داخل سلول میزبان مورد استفاده قرار گرفته و آنها را برای رونویسی و تکثیر دچار مشکل کند. بنابراین ویرایش ژن می‌تواند پتانسیل درمانی برای عفونت‌های چالش‌برانگیز ارائه دهد [۳۹].



شکل۳. مکانیسم عملکرد تکنولوژی کریسپر در ژن‌درمانی. شکل برگرفته از مقاله [۳۹] می‌باشد.

نتیجه‌گیری

تکنولوژی کریسپر به عنوان یک کشف برجسته و نوظهور در زمینه مهندسی ژنتیک پدیدار شده و تأثیر عمده‌ای در بسیاری از زمینه‌های پزشکی بالینی دارد. به علاوه این تکنیک دقت و کیفیتی مشابه روش‌های پیشین در تشخیص بیماری‌های عفونی دارد و ارزان‌تر از تکنیک‌های پیشین است. در این مقاله ما مواردی را در خصوص ویروس سایتومگال انسانی از جمله شیوع، چرخه مولکولی عفونت‌زایی، استفاده از کریسپر در تشخیص سریع و کم‌هزینه و همچنین درمان این ویروس با این روش بررسی کردیم. با این حال چالش‌های مالی و مدیریتی قابل توجهی در استفاده از روش‌های ژن‌درمانی به‌خصوص ویرایش ژن از طریق تکنولوژی کریسپر وجود دارد که باید قبل از استفاده از

آن در مقیاس‌های بزرگ و جهانی مورد توجه قرار گیرد. پیشرفت چشمگیر تکنولوژی در دهه‌های اخیر و درک بهتر از دوام و ایمنی ویرایش ژن، ممکن است در آینده منجر به شناخت بهتری از روش‌های ایمن‌تر و با کارایی بالاتر در درمان بیماری‌های ژنتیکی، عفونت‌های ویروسی مزمن، انواع سرطان‌ها و بیماری‌های خونی گردد. تشخیص و درمان‌های مبتنی بر کریسپر احتمالاً در آینده نزدیک در موارد بالینی مورد استفاده قرار خواهند گرفت و پزشکان باید از پتانسیل فوق‌العاده این روش و خطرات بالقوه آن آگاه باشند.

References

1. Nikolich-Žugich, J. and R. A. van Lier; "Cytomegalovirus (CMV) research in immune senescence comes of age: overview of the 6th International Workshop on CMV and Immunosenescence", **Geroscience**; 39(3), 2017, pp.245-249.
2. Al Mana, H., et al.; "The current status of cytomegalovirus (CMV) prevalence in the MENA region: A systematic review", **Pathogens**; 8(4), 2019, p.213.
3. Sylwester, A. W., et al.; "Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects", **The Journal of experimental medicine**; 202(5), 2005, pp.673-685.
4. Lancini, D., et al., "Cytomegalovirus disease in immunocompetent adults", **Medical Journal of Australia**;. 201(10), 2014, pp.578-580.
5. Cannon, M. J., D. S. Schmid, and T. B. Hyde; "Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection", **Reviews in medical virology**; 20(4), 2010, pp.202-213.
6. Control, C. f. D. and Prevention; Cytomegalovirus (CMV) and congenital CMV infection. Testing and diagnosis of CMV infection [http://www.cdc.gov/cmv/testing-diagnosis.html], 2016.
7. Murphy, E., et al., "Reevaluation of human cytomegalovirus coding potential", **Proceedings of the National Academy of Sciences**; 100(23), 2003, pp.13585-13590.
8. Stern-Ginossar, N., et al., "Decoding human cytomegalovirus", **Science**; 338(6110), 2012, pp.1088-1093.
9. Isaacson, M., L. Juckem, and T. Compton; "Virus entry and innate immune activation", **Human Cytomegalovirus**; 2008, pp.85-100.
10. Gibson, W.; "Structure and formation of the cytomegalovirus virion", **Human cytomegalovirus**; 2008, pp.187-204.
11. Kalejta, R.; "Functions of human cytomegalovirus tegument proteins prior to immediate early gene expression", **Human cytomegalovirus**; 2008, pp.101-115.
12. Ogawa-Goto, K., et al.; "Microtubule network facilitates nuclear targeting of human cytomegalovirus capsid", **Journal of virology**; 77(15), 2003, pp.8541-8547.

13. Cristea, I. M., et al.; “Human cytomegalovirus pUL83 stimulates activity of the viral immediate-early promoter through its interaction with the cellular IFI16 protein”, **Journal of virology**; 84(15), 2010, pp.7803-7814.
14. Hwang, J. and R. F. Kalejta; Proteasome-dependent, ubiquitin-independent degradation of Daxx by the viral pp71 protein in human cytomegalovirus-infected cells”, **Virology**; 367(2), 2007, pp.334-338.
15. Li, T., J. Chen, and I. M. Cristea; “Human cytomegalovirus tegument protein pUL83 inhibits IFI16-mediated DNA sensing for immune evasion”, **Cell host & microbe**; 14(5), 2013, pp.591-599.
16. Yu, Y., A. J. Clippinger, and J. C. Alwine; “Viral effects on metabolism: changes in glucose and glutamine utilization during human cytomegalovirus infection”, **Trends in microbiology**; 19(7), 2011, pp.360-367.
17. Yurochko, A., “Human cytomegalovirus modulation of signal transduction”, **Human Cytomegalovirus**; 2008, pp.205-220.
18. Chambers, J., et al.; DNA microarrays of the complex human cytomegalovirus genome: profiling kinetic class with drug sensitivity of viral gene expression”, **Journal of virology**; 73(7), 1999, pp.5757-5766.
19. Mocarski, E., et al.; Cytomegaloviruses In: Knipe DM, Howley PM, editors; **Fields virology**; 6th ed Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013, pp.1960-2014.
20. Buchkovich, N. J., T. G. Maguire, and J. C. Alwine; “Role of the endoplasmic reticulum chaperone BiP, SUN domain proteins, and dynein in altering nuclear morphology during human cytomegalovirus infection”, **Journal of virology**; 84(14), 2010, pp.7005-7017.
21. Hamirally, S., et al.; “Viral mimicry of Cdc2/cyclin-dependent kinase 1 mediates disruption of nuclear lamina during human cytomegalovirus nuclear egress”, **PLoS pathogens**; 5(1), 2009, pp.e1000275.
22. Moorman, N. J., et al.; “A targeted spatial-temporal proteomics approach implicates multiple cellular trafficking pathways in human cytomegalovirus virion maturation”, **Molecular & Cellular Proteomics**; 9(5), 2010, pp.851-860.

23. Das, S. and P. E. Pellett; “Spatial relationships between markers for secretory and endosomal machinery in human cytomegalovirus-infected cells versus those in uninfected cells”, **Journal of virology**; 85(12), 2011, pp.5864-5879.
24. Das, S., A. Vasanji, and P. E. Pellett; “Three-dimensional structure of the human cytomegalovirus cytoplasmic virion assembly complex includes a reoriented secretory apparatus”, **Journal of virology**; 81(21), 2007, pp.11861-11869.
25. Beltran, P. M. J. and I. M. Cristea; “The life cycle and pathogenesis of human cytomegalovirus infection: lessons from proteomics”, **Expert review of proteomics**; 11(6), 2014, p.697.
26. Filip, L.; “Genetic enhancement, TED talks and the sense of wonder”, **Medical Humanities**; 47(2), 2021, pp.210-218.
27. Jansen, R., et al.; Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes”, **Molecular microbiology**; 43(6), 2002, pp.1565-1575.
28. Makarova, K. S., et al.; “Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants”, **Nature Reviews Microbiology**; 18(2), 2020, pp.67-83.
29. Bhattacharyya, R. P., S. G. Thakku, and D. T. Hung; “Harnessing CRISPR effectors for infectious disease diagnostics”, **ACS Infectious Diseases**; 4(9), 2018, pp.1278-1282.
30. Katalani, C., et al.; “CRISPR-based diagnosis of infectious and noninfectious diseases”, **Biological procedures online**; 22(1), 2020, pp.1-14.
31. Kocak, D. D. and C. A. Gersbach; **From CRISPR scissors to virus sensors**; Nature Publishing Group, 2018.
32. Hsu, J. L. and S. L. Glaser; “Epstein–Barr virus-associated malignancies: epidemiologic patterns and etiologic implications”, **Critical reviews in oncology/hematology**; 34(1), 2000, pp.27-53.
33. Kruse, E., et al.; “CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing of Herpesviruses Limits Productive and Latent Infections”, **PLoS pathogens**; 12(6), 2016, pp.e1005701-e1005701.
34. Caliendo, A. M. and R. L. Hodinka; “,A CRISPR Way to Diagnose Infectious Diseases”, **New England Journal of Medicine**; 377(17), 2017, pp.1685-1687.
35. Traylen, C. M., et al.; “Virus reactivation: a panoramic view in human infections”, **Future virology**; 6(4), 2011, pp.451-463.

36. Lieberman, P. M., “Epigenetics and genetics of viral latency”, **Cell host & microbe**; 19(5), 2016, pp.619-628.
37. Virgin, H. W., E. J. Wherry, and R. Ahmed; “Redefining chronic viral infection”, **Cell**; 138(1), 2009, pp.30-50.
38. Binnie, A., et al.; “CRISPR-based strategies in infectious disease diagnosis and therapy”, **Infection**; 49(3), 2021, pp.377-385.
39. Lin, C., et al.; “Increasing the efficiency of CRISPR/Cas9-mediated precise genome editing of HSV-1 virus in human cells”, **Scientific reports**; 6(1), 2016, pp.1-13.
40. Ran, F., et al.; “Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system”, **Nature protocols**; 8(11), 2013, pp.2281-2308.
41. King, M. W. and J. Munger; “Editing the human cytomegalovirus genome with the CRISPR/Cas9 system”, **Virology**; 529, 2019, pp.186-194.
42. Yin, L., et al.; "CRISPR-Cas based virus detection: Recent advances and perspectives", **Biosensors and Bioelectronics**;. 193, 2021, pp.113541.
43. Manandhar, T., et al.; "Battle between host immune cellular responses and HCMV immune evasion", **International Journal of Molecular Sciences**; 20(15): 2019, p.3626.