

## УЧАСТИЕ ЦИТОСКЕЛЕТА КЛЕТКИ В ИНФЕКЦИОННОМ ЦИКЛЕ ВИРУСОВ ГРИППА А

© Т. Д. Смирнова, Д. М. Даниленко, А. В. Слита

Научно-исследовательский институт гриппа Минздрава РФ, Санкт-Петербург;  
электронный адрес: [cellcultures@influenza.spb.ru](mailto:cellcultures@influenza.spb.ru)

Проблема заболеваемости вирусом гриппа по-прежнему остается актуальной в связи с вероятностью появления новых мутантных или реассортантных форм вируса. Применяемые меры профилактики не дают полной защиты, а используемые противовирусные препараты нередко приводят к возникновению мутантных, устойчивых вариантов вируса. В последние годы все больше внимания уделяется поиску новых мишеней для прерывания вирусной инфекции, не связанных с вирусными белками, а направленных на клеточные механизмы, участвующие в процессе вирусной репродукции. Для этого необходимо углубленное изучение взаимосвязи вируса с клеткой. В предлагаемом обзоре литературы рассматриваются этапы взаимодействия вируса гриппа А с одной из важнейших клеточных структур — цитоскелетом, в частности со сложной динамической системой актиновых микрофиламентов и микротрубочек. Это взаимодействие наблюдается с самых первых моментов контакта вируса с клеткой — адсорбцией, эндоцитозом, освобождением вирусного рибонуклеопротеина (vRNP) и проникновением его в клеточное ядро. Значительна также роль клеточного цитоскелета на поздних стадиях созревания вирусной частицы — транслокации vRNP из ядра, сборки вируса и его выхода из клетки в процессе почкования. Обнаружение в вирусной частице клеточных белков, по-видимому, не является случайным, а отражает особенность взаимосвязи вируса и клетки.

Ключевые слова: вирус гриппа, клетка, цитоскелет, эндоцитоз, почкование.

Принятые сокращения: ЦПД — цитопатическое действие, HA — гемагглютинин, M1 — матриксный белок, M2 — вирусный белок, формирующий ионный канал, NA — нейраминидаза, NP — нуклеопротеин, RNP — нуклеопротеин в комплексе с вирусной РНК, SA — сиаловая кислота, vRNP — нуклеопротеин в комплексе с геномной РНК вируса.

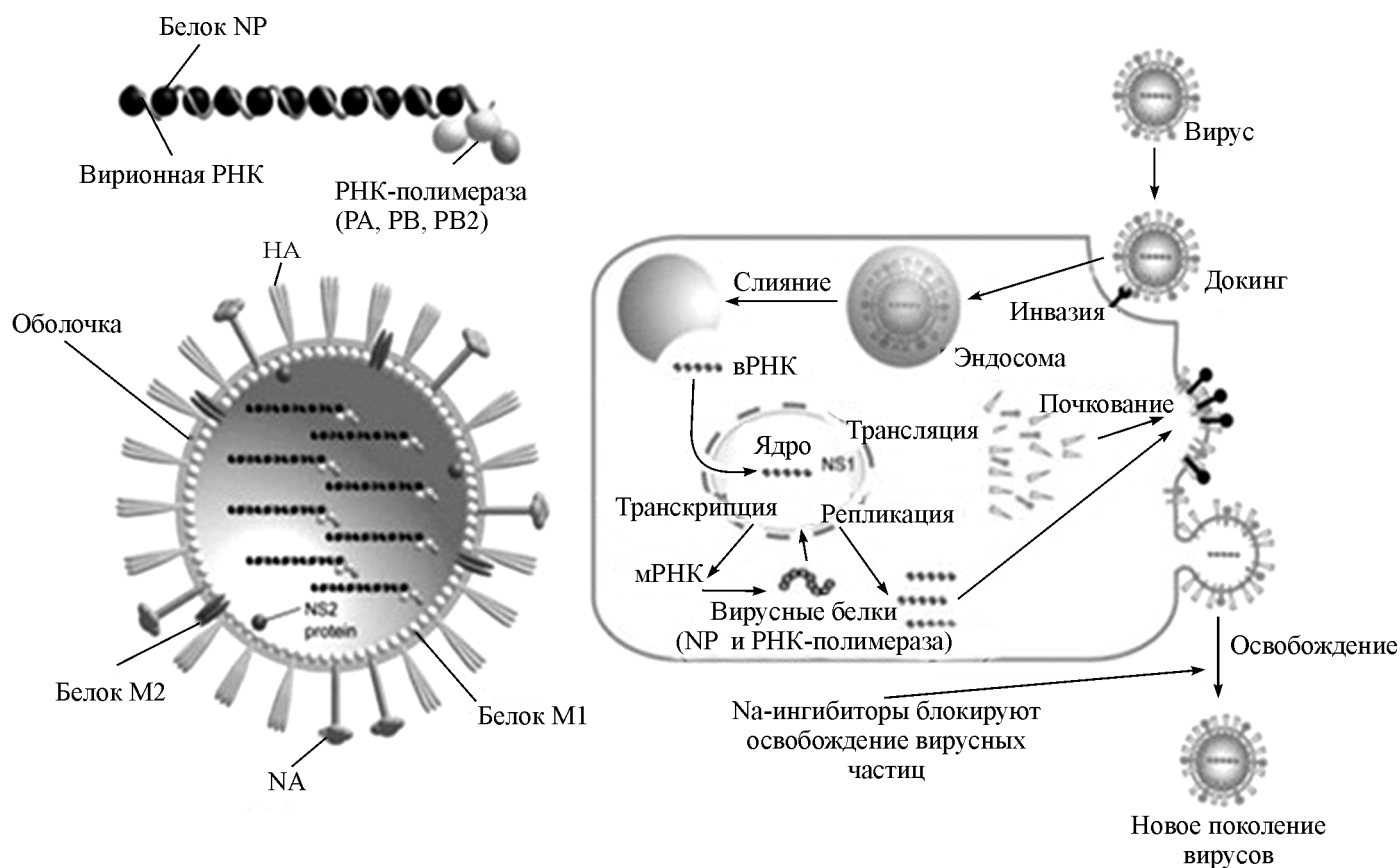
Инфекционный путь вируса гриппа — это комплексный, многостадийный процесс. Являясь облигатным внутриклеточным паразитом, вирус гриппа, как и все вирусы, использует множество путей для успешного проникновения в клетки, репродукции и последующего распространения в организме хозяина.

Вследствие быстрого приобретения вирусом гриппа устойчивости к применяемым противовирусным препаратам в последние годы получила широкое распространение разработка методов антивирусной терапии, направленных на определенные мишени в клетке-хозяине (Ludwig et al., 2006). В связи с этим углубленное изучение стадий репликативного цикла вируса гриппа может способствовать не только лучшему пониманию процессов, происходящих в инфицированной клетке, но и помочь в поиске новых мишеней для антивирусной терапии, не связанных с вирусными белками. Наибольший интерес представляет изучение ранних стадий контакта вируса с клеткой (адсорбция вируса, эндоцитоз, запуск митогенактивируемых сигнальных путей (MAPK), фосфатидил-инозитольного пути), ингибирование которых позволит прервать инфекционный процесс в самом начале.

Цикл вируса начинается лишь после его попадания в хозяйскую клетку. При этом для проникновения, перемещения внутри клетки и выхода наружу вирусы использу-

ют компоненты цитоскелета, который, по-видимому, принимает участие почти на всех стадиях жизненного цикла вируса гриппа (Bucher et al., 1989; Simpson-Holley et al., 2002; Arcangeletti et al., 2008). Понимание особенностей взаимодействия вируса с цитоскелетом и процессов, связанных с его ремоделированием, также может выявить новые мишени для антивирусной терапии.

Основной клеточной линией, рекомендованной ВОЗ для выделения и исследования свежеевыделенных образцов вируса гриппа А, является перевиваемая линия клеток MDCK (почка собаки), которая отличается высокой чувствительностью (пермиссивностью) ко всем подтипам вируса гриппа А, т. е. поддерживает вирусную репродукцию в высоких титрах и вызывает разрушение монослоя клеток. Среди перевиваемых клеточных линий человеческого происхождения только клетки СаСо-2 (карцинома ободочной кишки) сравнимы по пермиссивности с клетками MDCK. Большинство перевиваемых клеточных линий человеческого происхождения либо слабо чувствительны к вирусам гриппа А, либо совсем нечувствительны, как например к вирусу пандемического свиного гриппа А(H1N1pdm) (Li et al., 2009). Тем не менее даже при отсутствии цитопатического действия (ЦПД) и зрелых вирусных частиц в культуральной жидкости в клетках человека возникает латентная инфекция вируса грип-



Организация геномного сегмента, строение и жизненный цикл вируса гриппа типа А (Киселев, 2011).

Объяснения см. в тексте. Рисунок печатается с любезного разрешения автора.

па А, а разрушение клеток происходит путем апоптоза (Даниленко и др., 2011). Существует множество факторов, определяющих перmissивность клеток к вирусам гриппа А, к которым относятся также и биологические особенности самого вируса. Условия, присутствующие в клетках для осуществления нормального процесса репродукции вируса гриппа начиная с начальных стадий контакта вируса гриппа и клетки, влияют на развитие дальнейших событий: способность вируса инфицировать определенные органы и ткани (тропизм) определяет его распространение в организме и формирует характер и тяжесть протекания заболевания.

Предлагаемый обзор знакомит с основными этапами репродукции вируса гриппа А в перевиваемых клеточных линиях и с особенностями взаимодействия вируса с цитоскелетом клетки и, возможно, привлечет внимание цитологов и биохимиков к исследованиям в этой области.

### Краткая характеристика возбудителя

Вирус гриппа А относится к семейству Orthomyxoviridae, в состав которого входят оболочечные вирусы с сегментированным геномом, представленным односпиральной РНК с отрицательной полярностью. Геном вируса гриппа А состоит из 8 сегментов РНК, кодирующих 11—12 различных белков. 3 белка включаются в оболочку почкующихся вирионов: гемагглютинин (НА), нейраминидаза (NA) и матриксный белок (M2), формирующий ионные каналы и принимающий участие в почкова-

нии вируса. Кроме этого, почкующиеся вирусы включают в себя матриксный белок M1 и рибонуклеопротеиновый комплекс (vRNP), содержащий 8 сегментов РНК, нуклеопротеин (NP) и 3 полимеразы полимеразного комплекса (PA, PB1 и PB2).

Этапы репродукции вируса гриппа представлены на рисунке (Киселев, 2011). При заражении клеток-мишеней субъединица гемагглютинина HA1 связывается с сиаловыми кислотами (SA) на поверхности клеток-мишеней, и вирионы проникают в клетку с помощью эндоцитоза. Низкий pH внутри эндосомы вызывает конформационные изменения в субъединице HA2, приводящие к изменению конформации HA, и вызывает слияние вирусной и эндосомальной мембран. Ионные каналы, сформированные белком M2, способствуют дополнительному закислению среды внутри эндосомы, что приводит к диссоциации комплекса vRNP от матриксного белка M1 и последующему проникновению RNP в цитоплазму и далее — внутрь клеточного ядра. Репликация вирусной РНК протекает в ядре с участием трех вирусных полимераз (PA, PB1 и PB2). Синтез вирусных белков происходит в цитоплазме, процессинг белков M1, HA и NA осуществляется в эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи, после чего эти белки направляются к клеточной мембране. Вновь синтезированный вирусный белок NP направляется в ядро, где образует комплекс с вирусной РНК и полимеразой (RNP) и далее, при участии матриксного белка (M1), направляется из ядра в цитоплазму и к клеточной мембране для сборки вирусной частицы и образования оболочки из клеточной мембраны в процессе поч-

кования. Освобождение почкующихся вирусных частиц от клеточной мембраны осуществляется при участии поверхностного вирусного белка NA, который отщепляет сиаловые кислоты (SA), связывающие HA вируса с клетками и препятствующие освобождению вирусных частиц для дальнейшего инфицирования соседних клеток. 8-й сегмент РНК вируса гриппа кодирует так называемые неструктурные белки NS1 и NS2. Белок NS1 является основным фактором патогенности вируса гриппа, так как он подавляет трансляцию клеточной мРНК, а также синтез и работу системы интерферона с использованием различных механизмов. NS2 (NEP) обеспечивает ядерный экспорт вирусной РНК в комплексе с NP (Жилинская, 2003; Pinto, 2008).

### Ранние стадии репродукции вируса гриппа А

Адсорбция вируса на рецепторах клеточной мембраны. Процессу проникновения вируса гриппа в клетку предшествует его прикрепление к поверхностным рецепторам (корцепторам) с последующей интернализацией лигандов. Основными рецепторами вирусов гриппа на поверхности клетки-хозяина являются N-ацетилнейраминовые (сиаловые) кислоты, которые встречаются у клеток различных типов многих видов животных и человека (Bouvier, Palese, 2008). HA вируса гриппа обладает специфичностью в отношении связывания различных типов сиаловых кислот. Распределение  $\alpha$ -2,3- или  $\alpha$ -2,6-рецепторов на клеточной поверхности является одним из определяющих признаков клеточного тропизма и фактором, определяющим патогенез вирусов гриппа (Nicholls et al., 2007). Так, HA вируса гриппа птиц предпочтительно связывается с  $\alpha$ -2,3-сиаловыми кислотами, поскольку рецепторы именно такого типа преобладают в кишечном тракте водоплавающих птиц, представляющих собой естественный резервуар вирусов гриппа А. На поверхности эпителиальных клеток верхних дыхательных путей человека преобладают  $\alpha$ -2,6-сиаловые кислоты, хотя встречаются и  $\alpha$ -2,3; это объясняет тот факт, что хотя HA вируса гриппа человека специфически взаимодействует с  $\alpha$ -2,6-сиаловыми кислотами, вирусы гриппа птиц изредка способны инфицировать людей без предварительной адаптации (Gambaryan et al., 2005).

Вопрос о корцепторах вируса гриппа до сих пор остается слабо изученным. Есть данные, что при гриппозной инфекции макрофагов поверхностные вирусные белки HA и NA прямо взаимодействуют с доменом маннозных рецепторов, которые сами являются сиалированными белками. Дополнительные корцепторы, связанные с маннозой или галактозой, не только повышают репродукцию вируса в клетках, но и усиливают фагоцитоз в макрофагах мышей (Reading et al., 2000; Upham et al., 2010).

Для интернализации вируса в клетку необходим быстрый запуск специфических сигнальных путей, в частности PI3K и ERK1/2, требующих участия рецепторных тирозинкиназ; при этом известно, что сиаловые кислоты не способны проводить сигналы через клеточную мембрану. В этой связи было обнаружено, что вирус гриппа способен использовать корцепторы, относящиеся к семейству рецепторов эпидермального фактора роста, а также другие рецепторные тирозинкиназы, формируя липидную рафтовую сигнальную платформу (Eierhoff et al., 2010).

Проникновение (эндоцитоз) вируса в клетку. Эндоцитоз является фундаментальным свойством эукариотических клеток и используется большинством вирусов как основной путь проникновения в клетку. Среди различных путей проникновения вируса гриппа в клетку наиболее хорошо охарактеризован эндоцитоз через клатриновые ямки (Sieczkarski, Wittaker, 2002). Авторы показали, что вирусу гриппа для проникновения и последующей инфекции клеток HeLa необходимы как ранние, так и поздние эндосомы, тогда как для других оболочечных вирусов (везикулярного стоматита и вируса леса Семлики) требовалось функционирование только ранних эндосом. Специфическим регулятором образования поздних эндосом является протеинкиназа PKC $\beta$ II, которая активируется в процессе инфицирования клеток вирусом гриппа и необходима для его успешной интернализации (Sieczkarski, Whittaker, 2003).

Другой путь, используемый вирусом гриппа для проникновения в клетку, может осуществляться через клатриннезависимый эндоцитоз (Sieczkarski et al., 2003), а также с участием кавеол — маленьких инвагинаций, образованных на рафтах плазматической мембраны, которые характеризуются высоким содержанием холестерина, сфинголипидов и сфингомиелинов и располагаются преимущественно базально (Nunes-Correia et al., 2004). Обнаружен и еще один путь проникновения вируса гриппа в клетку в дополнение к классическому динаминзависимому и клатринсвязанному эндоцитозу — это неспецифический, динаминнезависимый макропиноцитоз (De Vries et al., 2011).

Использование флуоресцентной микроскопии позволило провести наблюдение за этапами проникновения отдельных частиц вируса гриппа, меченных липофильным красителем DiD в клетках CHO-K1. В передвижении отдельных вирусных частиц внутри клетки были выявлены три стадии, которые предшествовали слиянию вируса с эндосомами: актинзависимое передвижение вдоль клеточной периферии сменялось быстрым динеиннаправляемым передвижением в перинуклеарную область и, наконец, оканчивалось прерывистым движением в перинуклеарной области в направлении к плюс- и минус-концам микротрубочек (Lakadamyali et al., 2003).

Следует отметить, что раннее изучение проникновения вируса гриппа в клетки в основном проводилось с использованием неполяризованных клеток — фибробластов куриных эмбрионов (Patterson et al., 1979), клеток сирийского хомячка CHO-21 (Lakadamyali et al., 2003), клеток карциномы шейки матки человека HeLa (Sieczkarski et al., 2003), — в то время как основными входными воротами для вируса гриппа являются поляризованные клетки эпителия верхних дыхательных путей (Matrosovich et al., 2004).

Связь инфекционного процесса вируса гриппа с поляризованностью клеток и эндоцитозом. Актиновый цитоскелет является важным элементом для установления и поддержания состояния поляризации в эпителиальных клетках, в организации микроворостков на апикальной поверхности. В качестве основной модели поляризованных клеток используется, как правило, эпителиоидная клеточная линия почки собаки (MDCK). Роль цитоскелета (актина и микротрубочек) при эндоцитозе в поляризованных эпителиальных клетках хорошо изучена. Установлены существенные различия роли актина в эндоцитозе с апикальной и базолатеральной поверхностей: цитохалазин D подавляет эндоци-

тоз с апикальной поверхности за счет деполимеризации актина, однако не влияет на процесс эндоцитоза с базолатеральной поверхности клеток (Gottlieb et al., 1993; Arodasa, 2001). Показаны необходимость наличия неповрежденного актина для осуществления процесса эндоцитоза с апикальной поверхности клеток MDCK, регулирующая роль со стороны клатрина и ряда малых ГТФаз (ARF6) в этом процессе, а также нарушение апикальной эндоцитозной системы в результате коллапса микровыростов, который наступал при использовании дефектного клатрина (Human et al., 2006).

В последние годы внимание исследователей привлекло изучение особенностей ранних стадий репродукции вируса гриппа в клетках разной поляризованности, а также связи поляризации клеток с инфекционной активностью вируса. Было проведено подробное изучение механизмов проникновения вируса гриппа в ряд поляризованных и неполяризованных эпителиальных клеток (Sun, Whittaker, 2007). Критериями поляризованности служили определение трансэпителиальной электрической устойчивости (высокой у поляризованных клеток и низкой у неполяризованных), уровень экспрессии белка ZO-1 (маркера прочности межклеточной связи), а также способность вируса везикулярного стоматита (VSV), проникающего в клетки в основном базолатерально, инфицировать тестируемые клетки. По всем критериям клетки линий MDCKII, LLC-PK1::m1B, Calu-3 и CaCo-2 были отнесены авторами к истинно поляризованным клеткам, тогда как клетки линий BHK, CHO, HeLa и Mv1 имели все признаки неполяризованных. Авторы отмечают, что такие клеточные линии, как NCI-H292, A549, H441 и H1299, нередко используемые как модели поляризованных клеток, имели недостаточно выраженные критерии поляризованности, поскольку отличались невысоким содержанием и редким распределением белка ZO-1, а вирус VSV был способен инфицировать эти клетки базолатерально. Авторы показали, что в поляризованных клетках разрушение актинового цитоскелета цитохалазином D приводило к снижению проникновения вируса гриппа в клетку, возможно из-за нарушения интернализации и формирования эндоцитозных везикул в результате разрушения актиновых филаментов либо неспособности отделения образовавшихся эндоцитозных везикул от мембраны, что соответственно отражалось на снижении репродукции вируса гриппа.

Известно, что разные клеточные линии, даже будучи поляризованными и имеющими одинаковую тканевую принадлежность и морфологию (эпителий почек), могут иметь различную перmissивность для инфекции вирусом гриппа. В частности, клетки эпителия почки собаки MDCK высокоперmissивны в отличие от клеток обезьян (MA-104 и МК-2) аналогичного происхождения. Установлено, что уровень репродукции вируса гриппа в эпителиоидных линиях клеток MDCK (почка собаки) и МК-2 (почка макаки-резус) находился в зависимости от специфики организации подмембранной сети актина, которая играла решающую роль в перmissивности этих клеток (Arcangaletti et al., 2008). Более развитая актиновая сеть в неперmissивных клетках МК-2 служила барьером для вируса гриппа, связывая его на стадии эндоцитоза и ограничивая дальнейшее проникновение в ядро клетки, что сопровождалось снижением развития вирусной инфекции. Разрушение актиновой сети цитохалазином D значительно увеличивало эффективность инфекции на клетках МК-2, но абсолютно противоположный эффект — сни-

жение вирусной инфекции — был получен на перmissивных клетках MDCK, где подмембранная актиновая сеть развита слабее.

Для более углубленного понимания различий в чувствительности клеток одинакового происхождения (эпителий почек) к инфекции вируса гриппа были изучены различные пути проникновения вируса в клетку (De Soto et al., 2011). Авторы использовали ряд компонентов, ингибирующих различные пути интернализации вируса гриппа (высланные клатрином ямки, эндоцитоз, опосредованный кавеолами (рафтами), и макропиноцитоз) в клеточных линиях эпителия почек, обладающих различной чувствительностью к вирусной инфекции. В качестве высокочувствительных были исследованы клетки линии MDCK (почка собаки), низкочувствительных — клетки линии LLC-MK2 (почка обезьяны), среднечувствительных — клетки линии NSK (почка свиньи).

Было показано, что исследуемый вирус гриппа способен одновременно использовать несколько путей проникновения, и эндоцитоз протекал быстрее в высокочувствительных клетках по сравнению с менее чувствительными. В клетках MDCK основным путем проникновения вируса являлся клатринзависимый эндоцитоз, тогда как макропиноцитоз был наиболее эффективным путем интернализации вируса в клетках LLC-MK2, поскольку ингибирование механизмов клатрин- и кавеолоопосредованного эндоцитоза в клетках LLC-MK2 значительно повышало их чувствительность к вирусу гриппа. Ингибитор клатринсвязанного эндоцитоза не оказывал какого-либо эффекта в клетках свиньи NSK, тогда как ингибиторы кавеолоопосредованного эндоцитоза и макропиноцитоза лишь незначительно повышали чувствительность клеток NSK к инфицированию вирусом гриппа. Таким образом, авторами на примере полуперmissивных клеток обезьяны и свиньи было показано, что блокирование специфического пути проникновения вируса гриппа в клетки способно активировать другие, альтернативные пути эндоцитоза, приводящие к более эффективной инфекции клеток. Приведенные выше данные объясняют преимущественное инфицирование вирусами гриппа поляризованных клеток эпителия верхних дыхательных путей и кишечника, о чем свидетельствуют результаты, полученные как *in vivo*, так и *in vitro* (Matrosovich et al., 2004; Li et al., 2009).

Следует, однако, отметить, что способность к эффективной инфекции клеток зависит не только от особенностей клеточной организации, но и от характеристики самого вируса. Базальные мембраны поляризованных клеток эпителия легких и эндотелия создают барьер для проникновения вируса гриппа в кровеносные сосуды и диссеминации вируса в организме. Различие в патогенезе низкопатогенного вируса сезонного гриппа человека А/Н1N1, вызывающего инфекцию верхних дыхательных путей, и высокопатогенного вируса птичьего гриппа А/Н5N1, способного к поражению различных внутренних органов, объясняют использованием разных путей проникновения вируса в клетки первичных клеточных культур эпителия и эндотелия легких человека (Chan et al., 2009). Если выход вирусных частиц вирусом обоих подтипов из клеток эпителия и эндотелия проходил в основном апикально, то заражение клеток эндотелия высокопатогенный вирус птичьего гриппа был способен осуществлять не только с апикальной, но и с базолатеральной стороны.

Представленные данные относительно особенностей путей проникновения вирусов гриппа разного происхож-

дения и разной патогенности в клетки важны для понимания патогенеза гриппозной инфекции, в частности способности вирусов А/Н5N1 распространяться в организме и вызывать генерализованную инфекцию.

### Поздние стадии репликации вируса гриппа (сборка, почкование)

Роль вирусных белков М1 и NP. Изучение взаимодействия вируса гриппа с элементами цитоскелета клетки позволило выявить тесную связь отдельных вирусных белков с актиновыми филаментами на поздних стадиях созревания вируса.

М1 является многофункциональным белком в жизненном цикле вируса гриппа, включая разделение, транскрипцию, экспорт vRNP, сборку и почкование. Для осуществления почкования вируса все вирусные структурные компоненты, включая нуклеокапсид (RNP), матриксный белок (М1) и поверхностные белки вируса (НА, NA и М2), должны быть транспортированы к месту сборки на плазматической мембране. Центральная роль в процессе созревания вирусной частицы отводится вирусному белку нуклеопротеину (NP), на транспорт которого влияют многочисленные факторы. После проникновения вируса в клетку и освобождения в эндосоме от поверхностных белков происходит быстрое и активное перемещение vRNP из цитозоля в нуклеоплазму через ядерные поры. Транспорт белка М1 в ядро происходит путем пассивной диффузии и независимо от vRNP, который проникает с помощью активных процессов (Kesley, Ari, 1991). Новый NP и белки полимеразного комплекса синтезируются в цитоплазме, а затем транспортируются в клеточное ядро, где они собираются в рибонуклеопротеиновый комплекс RNP, который позже покидает ядро для осуществления процесса почкования зрелого вируса на клеточной мембране.

Локализацию нуклеопротеина (ядерную или цитоплазматическую) определяют многочисленные факторы, прежде всего наличие сигналов, находящихся в самом белке NP (Bullido et al., 2000; Wu, Pante, 2009), а также в вирусном белке NEP, который участвует в экспорте RNP (Noda et al., 2006). На ядерный транспорт NP заметно влияют статус клеточного фосфорилирования (Bui et al., 2000), а также плотность клеточного монослоя (Bui et al., 2002). Но основную функцию в ядерном экспорте vRNP выполняет вирусный белок М1, продукция которого при использовании ингибитора протеинкиназы подавлялась, а vRNP оставался в ядре (Bui et al., 2000).

Убедительно показана связь белков М1 и NP с актином (Bucher et al., 1989): с помощью моноклональных антител к белку М1 установлены миграция этого белка из ядра в цитоплазму в процессе репликативного цикла вируса и последующая связь белка М1 с актиновыми филаментами в цитоплазме.

Связь вирусных белков М1 и NP с цитоскелетом клеток MDCK и MDBK при заражении вирусом гриппа А показана с помощью биохимических методов, а также с использованием цитохалазина D для деполимеризации F-актина (Avalos et al., 1997). Морфологический анализ выявил, что М1 и NP взаимодействуют с актиновыми филаментами клетки, при этом связи с  $\beta$ -тубулином и виментином не было обнаружено. Тем не менее были показаны различия, наблюдаемые в разные промежутки времени между вирусными белками М1 и NP: связь NP с

цитоскелетом обнаруживалась уже на ранней стадии вирусной инфекции, тогда как М1 на ранней стадии был очень слабо связан с белками цитоскелета. Эта связь подавлялась циклогексимидом, ингибитором синтеза белка на рибосомах, что, по мнению авторов, указывало на необходимость синтеза других белков, т. е. М1 не связывается с белками цитоскелета напрямую, а взаимодействует через другие вирусные белки, возможно рибонуклеопротеин (Avalos et al., 1997).

Очищенный NP, так же как и комплекс RNP, прочно соединяется с микрофиламентным актином *in vitro* (Digard et al., 1999); на NP определены сайты, ответственные за это взаимодействие. Авторами была установлена локализация экзогенного трансфецированного NP в клетках, которая зависела от активности экспрессии белка: небольшие количества NP проникали в ядро, а большие аккумуляровались в цитоплазме, где белок присоединялся к актину. Мутации в NP, снижающие его связь с F-актином, изменяли клеточное распределение белка, которое было в основном ядерным, несмотря на высокий уровень его экспрессии.

Целый ряд работ убедительно демонстрирует роль Rab11 ГТФазы в транспорте vRNP к месту почкования на апикальной поверхности клетки, а также участие в этом процессе рециклирующих эндосом и микротрубочек. Использование биохимических методов позволило установить образование комплекса между клеточной изоформой ГТФазы Rab11A и вирусным RNP; с помощью флуоресцентно меченных антител к NP вируса изучены все стадии цитоплазматического транспорта vRNP (Eisfeld et al., 2011; Momose et al., 2011). С помощью методов FISH-гибридизации и прижизненной микроскопии выявлена колокализация Rab11 и RNP; показано, что на ранних стадиях сборки вируса vRNP аккумулируется рядом с центром организации микротрубочек (Amorim et al., 2011).

Обнаружено, что гриппозная инфекция приводит к повышенному уровню ацетилирования микротрубочек, в результате чего увеличивается выход вновь образованных вирионов из клетки (Husein, Harrod, 2011). Поскольку все компоненты вириона нуждаются в транспорте к апикальной мембране, авторы предполагают, что ацетилирование микротрубочек может являться одним из факторов, влияющих на эффективность транспорта вирусных компонентов к месту сборки.

Таким образом, существует комплексность сигналов и факторов, регулирующих ядерно-цитоплазматический транспорт вирусного RNP. Сочетание маскировки и демаскировки сигналов ядерной локализации, следующих в строгой последовательности в процессе инфекционного цикла, взаимоотношение NP с РНК и вирусными белками (полимеразами, М1, NS2) и участие в процессах, происходящих в клетке (фосфорилирование и дефосфорилирование, стимуляция пролиферации, плотность клеточного монослоя), а также взаимосвязь с элементами актинового цитоскелета и микротрубочками влияют на созревание и полноценную продукцию вирусных частиц.

Участие миозина в клетке. Изучение роли миозинового мотора в процессе проникновения вируса гриппа в клетку показало, что в поляризованных клетках с нарушенной экспрессией полноценного миозина VI наблюдалось значительное снижение вирусной инфекции, тогда как в неполяризованных клетках данный эффект отмечен не был (Sun, Whittaker, 2007).

Участие миозина в обеспечении гриппозной инфекции в поляризованных клетках линии MDCK и первич-

ной культуры клеток эндотелия пупочного канатика человека (HUVEC) было подтверждено (Haidari et al., 2011). Авторы использовали целый ряд соединений, ингибирующих киназу и фосфатазу легкой цепи миозина (ЛЦМ). Было показано, что соединения, ингибирующие фосфорилирование ЛЦМ (или киназу ЛЦМ), ингибируют и развитие последующей гриппозной инфекции. При этом блок или угнетение фосфатазы ЛЦМ приводили к противоположному эффекту: титры вируса увеличивались дозозависимо при повышении концентрации ингибитора. Авторам удалось продемонстрировать, что вирус гриппа при инфицировании клеток активирует сигнальные пути, индуцирующие как фосфорилирование ЛЦМ, так и ремоделирование актинового цитоскелета. Более того, полученные данные о том, что блок фосфорилирования ЛЦМ привел к удержанию вирусных RNP комплексов в клеточном ядре и препятствовал успешной репликации вируса.

Филаментозные формы вируса гриппа. Вирус гриппа может образовывать различные по размеру и форме частицы: размер сферических частиц составляет 80—120 нм, в то время как филаментозные частицы достигают в длину 1 мкм (с сохранением толщины, равной диаметру сферических форм). Установлено, что свежие клинические изоляты вируса гриппа характеризуются значительным содержанием филаментозных форм, а длительное пассирование штаммов вируса на куриных эмбрионах и клеточных культурах приводит к изменению морфологии вируса, который начинает образовывать почти исключительно сферические частицы.

Поскольку матриксный белок вируса гриппа М1 является главным белком, участвующим в образовании капсида и осуществляющим связь между vRNP и поверхностными вирусными белками HA и NA, которые независимо от капсида встраиваются в рафты цитоплазматической мембраны, ему отводится основная роль в сборке и процессе почкования вируса. Применение молекулярно-генетических методов показало, что мутации в 7-м фрагменте вирусной РНК, кодирующей белок М1, играют значительную роль в формировании филаментозных форм вируса гриппа (Bourmakina, Garcia-Sastre, 2003; Elleman, Barclay, 2004).

Помимо генетических особенностей самой вирусной частицы обнаружено, что возможность формирования филаментозных частиц при почковании вируса гриппа напрямую определяется клеточным цитоскелетом, а также поляризацией клеток. Было показано, что обработка клеток цитохалазином D полностью блокирует формирование филаментозных форм, однако не оказывает влияния на формирование сферических частиц и на титры вируса в целом. Более того, формирование филаментозных форм происходит только в поляризованных клетках, где имеется хорошо сформированный актиновый кортекс. При инфицировании неполяризованных клеток наблюдается формирование исключительно сферических частиц, а ингибиторы актина не оказывали влияния ни на инфекционность вируса, ни на процесс сборки и формирования частиц в этих клетках (Roberts, Compans, 1998; Elleman, Barclay, 2004).

Подробно описано образование уникальных кольцевидных структур вируса, возникающих в результате специфической реорганизации вирусных белков HA, М1 и RNP после разрушения цитоскелета с помощью ингибиторов (цитохалазина D, джасплакинолина, латрикулина) (Simpson-Holley et al., 2002). Эти вирусные кольцевидные структуры формировались вокруг сердцевин из агреги-

рованного  $\beta$ -актина, расположенного под плазматической мембраной, причем удаление ингибиторов из среды приводило к восстановлению нормальной сети актинового цитоскелета, исчезновению кольцеобразных структур и формированию филаментозных частиц вируса. Авторы показали, что зависимость сборки филаментозных форм вируса от сети актиновых микрофиламентов отражает связь между вирусными белками, актином и рафтами в месте сборки и почкования вирусных частиц. Было сделано предположение о том, что для сборки сферических частиц необходим и достаточен лишь один рафт-домен в мембране, в то время как филаментозные формы требуют участия сразу нескольких рафт-доменов. В связи с этим роль актина может заключаться и в том, что он позволяет сблизить соседствующие рафт-домены на цитоплазматической мембране и таким образом способствует успешному формированию филаментозных форм вируса гриппа.

Отмечена также роль в формировании филаментозных форм вируса гриппа малых ГТФаз из семейства Rab11, вовлекаемых в процесс транспорта белков и везикул между сетью транс-Гольджи, рециклирующими эндосомами и плазматической мембраной. Функции Rab11 модулируются белками из семейства FIP, которые непосредственно направляют Rab11 к месту локализации и связывают их с актином или микротрубочками. Для формирования филаментозных форм вируса было необходимо присутствие как белка Rab11, так и Rab11-FIP3; последний белок не требовался при почковании сферических форм, тогда как Rab11 требовался для образования обеих форм вируса (Bruce et al., 2010). Таким образом, вовлечение системы цитоскелета (актиновых филаментов и микротрубочек) в процесс сборки и почкования вируса гриппа на поздних стадиях его морфогенеза считается подтвержденным фактом.

Функциональное назначение актина, захваченного оболочечными вирусами, пожалуй, может объяснить работа, проведенная на клетках HeLa, зараженных вирусом осповакцины (Cudmore et al., 1995). С помощью электронной микроскопии авторы показали процесс выталкивания из клетки вирусной частицы тязем актина. Кроме этого, результаты видеомикроскопии продемонстрировали передвижение вирусных частиц к соседним клеткам, при этом вирусные частицы использовали актиновый хвост как пропеллер. Вполне вероятно, что вирус гриппа наряду с другими оболочечными вирусами, как и некоторые патогенные бактерии, использует захваченный актин для облегчения передвижения и колонизации новых клеток (Cudmore et al., 1995).

Клеточные белки в вирусных частицах. Одно из первых сообщений о включении вирусом гриппа в состав частицы белков цитоскелета клетки-хозяина было сделано Лоза-Тулимовска с соавторами (Loza-Tulimowska et al., 1976, 1977, 1979). Они обнаружили аутоантитела к актомиозину в сыворотках людей с естественной гриппозной инфекцией, а также у иммунизированных инактивированной вакциной, кроме того, в сыворотках животных, иммунизированных очищенным вирусом гриппа. Далее, с помощью электронной микроскопии было подтверждено, что несколько штаммов вируса гриппа реагировали с иммунной сывороткой против актомиозина, но только после обработки вируса бромелайном, удаляющим с поверхности вируса шипики гемагглютинина и нейраминидазы. Положительная реакция преципитации между очищенными белками вируса гриппа и сывороткой к актомиозину была получена и в ракет-

ном электрофорезе (Loza-Tulimovska et al., 1981). Авторы высказали предположение о включении компонентов клетки-хозяина (актина) в структуру вируса гриппа.

В эти же годы клеточный актин был обнаружен и во многих других оболочечных вирусах. С помощью электрофореза было показано, что актин является внутренним компонентом вируса кори (Tyrell, Norrby, 1978). Только сравнительно недавно эти ранние сообщения о захватывании вирусной частицей клеточных белков были подтверждены современными методами очистки вирусных частиц, полностью исключаяющими возможность адсорбции клеточных белков на вирусной оболочке.

Существовавшее длительное время мнение о том, что вирус гриппа в процессе почкования одевается оболочкой, происходящей из рафтов клеточной мембраны, и замещает от клеточной мембраны только липиды, было изменено четкими доказательствами того, что вирусная частица включает в себя еще и клеточные белки, в частности актин. Появление нового направления — протеомики — возобновило интерес к белковым составляющим вирусной частицы. С помощью двух дополняющих друг друга методов масс-спектрометрии был проведен протеомный анализ высокоочищенных частиц вируса гриппа, выращенных в клетках Vero (почка зеленой марthyшки) и A-549 (карцинома легких человека) (Shaw et al., 2008). Было показано, что высокоочищенные вирусные частицы помимо 9 вирусных белков и липидов оболочки содержали еще и многочисленные клеточные белки, 36 из которых было идентифицировано. Эти клеточные белки присутствовали как внутри вирусной частицы, так и в вирусной мембране. Среди них были и цитоплазматические, и мембранные клеточные белки, которые относились к разным функциональным категориям, таким как белки цитоскелета, аннексины, гликолитические ферменты и тетрапанины.

### Заключение

Использование методов широкомасштабного скрининга генов и белков, экспрессируемых клетками в ходе инфекции вирусами гриппа, позволило выявить широкий круг факторов клетки-хозяина, вовлеченных в репродуктивный цикл вируса на разных стадиях (König et al., 2010; Watanabe et al., 2010). Роль многих клеточных белков, активированных при гриппозной инфекции, была установлена впервые, однако пока не много известно о конкретных механизмах взаимодействия клеточных факторов и вирусных белков. Тем не менее обнаружение белков цитоскелета в вирусной частице и активация генов и белков цитоскелета клетки в процессе инфекции вирусом гриппа убедительно свидетельствуют о важной роли этой клеточной структуры в инфекционном цикле вируса гриппа. При этом следует обратить серьезное внимание на роль белков цитоскелета в проведении многочисленных сигналов с клеточной мембраны в ядро клетки (Пинаев, 2009), поскольку известно, что вирус гриппа способен не только активировать, но и манипулировать клеточными сигнальными путями для обеспечения наиболее благоприятных условий собственной репродукции (Ludwig et al., 2006).

В последние годы получила широкое распространение разработка альтернативных методов противовирусной терапии, направленных на мишени в клетке-хозяине. В связи с этим углубленное изучение стадий репликативного цикла вируса гриппа может способствовать не только

лучшему пониманию процессов, происходящих в инфицированной клетке, но и помочь в поиске новых мишеней для противовирусной терапии, не связанных с вирусными белками. Наибольший интерес представляет изучение ранних стадий контакта вируса с клеткой (адсорбция вируса, его эндоцитоз, запуск митогенактивируемых сигнальных путей, фосфатидил-инозитольного пути), ингибирование которых позволит прервать инфекционный процесс в самом начале.

### Список литературы

- Даниленко Д. М., Смирнова Т. Д., Гудкова Т. М., Ерошкин М. Ю., Киселев О. И. 2011. Сравнительное изучение чувствительности клеточных линий различного происхождения к вирусам пандемического гриппа H1N1v, вирусам гриппа птиц, свиней и человека. Вопросы вирусологии. 6 : 14—19.
- Жилинская И. Н. 2003. Структура вируса гриппа. В кн.: Грипп и другие респираторные вирусные инфекции: эпидемиология, профилактика, диагностика и терапия. СПб.: Боргес. 42—54.
- Киселев О.И. 2011. Геном пандемического вируса гриппа A/H1N1v-2009. М.; СПб.: Димитрейд График Групп. 164 с.
- Пинаев Г. П. 2009. Сократительные системы клетки: от мышечного сокращения к регуляции клеточных функций. Цитология. 51 (3) : 172—181.
- Amorim M. J., Bruce E. A., Read E. K., Foeglein A., Mahem R., Stuart A. D., Digard P. 2011. A Rab11- and microtubule-dependent mechanism for cytoplasmic transport of influenza A virus viral RNA. J. Virol. 85 : 4143—4156.
- Apodaca G. 2001. Endocytic traffic in polarized epithelial cells: role of the actin and microtubule cytoskeleton. Traffic. 2 : 149—159.
- Arcangaletti M. C., De Conto F., Ferraglia F., Pinardi F., Gatti R., Orlandini G., Covan S., Motta F., Rodighero I., Detto G., Chezzi C. 2008. Host-cell-dependent role of actin cytoskeleton during the replication of a human strain of influenza A virus. Arch. Virol. 153 : 1209—1221.
- Avalos R. T., Yu Z., Nayak D. 1997. Association of influenza virus NP and M1 proteins with cellular cytoskeletal elements in influenza virus-infected cells. J. Virol. 71 : 2947—2958.
- Bourmakina S., García-Sastre A. 2003. Reverse genetics studies on the filamentous morphology of influenza A virus. J. Gen. Virol. 84 : 517—527.
- Bouvier N. M., Palese P. 2008. The biology of influenza viruses. Vaccine. 26 : 49—53.
- Bruce E., Digard P., Stuart A. D. 2010. The Rab11 pathway is required for influenza A virus budding and filament formation. J. Virol. 84 : 5848—5859.
- Bucher D., Popple S., Baer M., Mikhail A., Gong Y. F., Whitaker C., Paoletti E., Judd A. 1989. M protein (M1) of influenza virus: antigenic analysis and intracellular localization with monoclonal antibodies. J. Virol. 63 : 3622—3633.
- Bui M., Myers J. E., Whittaker G. R. 2002. Nucleo-cytoplasmic localization of influenza virus nucleoprotein depends on cell density and phosphorylation. Virus Res. 84 : 37—44.
- Bui M., Wills E. G., Helenius A., Whittaker G. 2000. Role of the influenza virus M1 protein in nuclear export of viral ribonucleoproteins. J. Virol. 74 : 1781—1786.
- Bullido R., Gómez-Puertas P., Albo C., Portela A. 2000. Several protein regions contribute to determine the nuclear and cytoplasmic localization of the influenza A virus nucleoprotein. J. Gen. Virol. 81 : 135—142.
- Chan M. C., Chan R. W., Yu W. C., Ho C. C., Chui W. H., Lo C. K., Yuen K. M., Guan Y. I., Nicholls J. M., Peiris J. S. 2009. Influenza H5N1 virus infection of polarized human alveolar epithelial cells and lung microvascular endothelial cells. Respiratory Res. 10 : 102—111.
- Cudmore S., Cossart P., Griffiths G., Way M. 1995. Actin-based motility of vaccinia virus. Nature. 378 : 636—640.

- De Conto F., Covan S., Arcangaletti M.C., Orlandini G., Gatti R., Dettori G., Chezzi C. 2011. Differential infectious entry of human influenza A/NWS/33 virus (H1N1) in mammalian kidney cells. *Virus Res.* 1 : 221—230.
- De Vries E., Tscherne D. M., Wienholts M. J., Cobos-Jimenez V., Scholte F., Garcia-Sastre A., Rottier P. J., de Haan C. A. 2011. Dissection of the influenza A virus endocytic routes reveals macropinocytosis as an alternative entry pathway. *PLoS Pathogens.* 7 : e1001329.
- Digard P., Elton D., Bishop K., Medcalf E., Weeds A., Pope B. 1999. Modulation of nuclear localization of the influenza virus nucleoprotein through interaction with actin filaments. *Virology.* 73 : 2222—2231.
- Eierhoff T., Hrinčius E. R., Rescher U., Ludwig S., Ehrhardt C. 2010. The epidermal growth factor receptor (EGFR) promotes uptake of influenza A viruses (IAV) into host cells. *PLoS Pathogens.* 6 : e1001099.
- Eisfeld A. J., Kawakami E., Watanabe T., Watanabe T., Neumann G., Kawaoka Y. 2011. Rab11A is essential for transport of the influenza virus genome to the plasma membrane. *J. Virol.* 85 : 6117—6126.
- Elleman C. J., Barclay W. S. 2004. The M1 matrix protein controls the filamentous phenotype of influenza A virus. *Virology.* 321 : 144—153.
- Gambaryan A. S., Karasin A. I., Tuzikov A. B., Chinarev A. A., Pazygina G. V., Bovin N. V., Matrosovich M. N., Olsen C. W., Klimov A. I. 2005. Receptor-binding properties of swine influenza viruses isolated and propagated in MDCK cells. *Virus Res.* 144 : 15—22.
- Gottlieb T. A., Ivanov I. E., Adesnik M., Sabatini D. D. 1993. Actin microfilaments play a critical role in endocytosis at the apical but not the basolateral surface of polarized epithelial cells. *J. Cell Biol.* 120 : 695—710.
- Haidari M., Zhang W., Ganjelei L., Ali M., Chen Z. 2011. Inhibition of MLC phosphorylation restricts replication of influenza virus — a mechanism of action for anti-influenza agents. *PLoS ONE.* 6 : e21444.
- Husein M., Harrod K. S. 2011. Enhanced acetylation of alpha-tubulin in influenza A virus infected epithelial cells. *FEBS Lett.* 585 : 128—132.
- Hyman T., Schmueel M., Altschuler Y. 2006. Actin is required for endocytosis at the apical surface of Madin-Darby Canine Kidney cells where ARF6 and clathrin regulate the actin cytoskeleton. *MBoC.* 17 : 427—437.
- Kesley M., Ari H. 1991. Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into the nucleus. *J. Virol.* 65 : 232—244.
- König R., Stertz S., Zhou Y., Inoue A., Hoffmann H., Bhattacharyya S., Alamares J. G., Tscherne D. M., Ortigoza M. B., Liang Y., Gao Q., Andrews S. E., Bandyopadhyay S., De Jesus P., Tu B. P., Pache L., Shih C., Orth A., Bonamy G., Miraglia L., Ideker T., Garcia-Sastre A., Yong J., Palese P., Shaw M., Chanda S. K. 2010. Human host factors required for influenza virus replication. *Nature.* 463 : 813—817.
- Lakadamyali M., Rust M. J., Babcock H. P., Zhuang X. 2003. Visualizing infection of individual influenza viruses. *PNAS.* 100 : 9280—9285.
- Li I. W. S., Chan K. H., To K. W. K., Wong S. S., Ho P. L., Lau S. K., Woo P. C., Tsoi H. W., Chan J. F., Cheng V. C., Zheng B. J., Chen H., Yuen K. Y. 2009. Differential susceptibility of different cell lines to swine-origin influenza A H1N1, seasonal human influenza A H1N1, and avian influenza A H5N1 viruses. *J. Clin. Virol.* 46 : 325—330.
- Losa-Tulimovska M., Michalak T., Semkow R. 1981. Попытка выявления актомиозина, ассоциированного с вирусом гриппа. *Acta Virologica.* 25 : 251—253
- Losa-Tulimovska M., Michalak T., Semkow R., Nowoslawski A. 1977. Аутоантитела в сыворотках кроликов, иммунизированных вирусом гриппа. *Acta Virologica.* 21 : 495—498.
- Losa-Tulimovska M., Semkow R., Michalak T., Nowoslawski A. 1976. Аутоантитела в сыворотках больных гриппом людей. *Acta Virologica.* 20 : 202—207.
- Losa-Tulimovska M., Semkow R., Michalak T., Wilczynski J. 1979. Аутоантитела в сыворотках человека после вакцинации инактивированной гриппозной вакциной. *Acta Virologica.* 23 : 159—161.
- Ludwig S., Pleschka S., Planz O., Thorsten W. 2006. Ringing the alarm bells: signaling and apoptosis in influenza virus infected cells. *Cell Microbiol.* 8 : 375—386.
- Matrosovich M. N., Matrosovich T. Y., Gray T., Roberts N. A., Klenk H. 2004. Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *PNAS.* 101 : 4620—4624.
- Momose F., Sekimoto T., Ohkura T., Jo S., Kawaguchi A., Nagata K., Moricawa Y. 2011. Apical transport of influenza A virus ribonucleoprotein requires Rab11-positive recycling endosome. *PLoS One.* 6 : e21123.
- Nicholls J. M., Bourne A. J., Chen H., Gun G. Y., Peiris M. 2007. Sialic acid receptor detection in the human respiratory tract: evidence for widespread distribution of potential binding sites for human and avian influenza viruses. *Respiratory Res.* 8 : 73—80.
- Noda T., Sagara H., Yen A., Takada A., Kida H., Cheng R. H., Kawaoka Y. 2006. Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. *Nature.* 439 : 490—492.
- Nunes-Correia I., Eulalio A., Nir S., Pedroso de Lima M. C. 2004. Caveolae as an additional route for influenza virus endocytosis in MDCK cells. *Cell Mol. Biol. Lett.* 9 : 47—60.
- Patterson S., Oxford J. S., Dourmashkin R. R. 1979. Studies on the mechanism of influenza virus entry into cells. *J. General Virol.* 43 : 223—229.
- Pinto R. 2008. Therapeutic *in vitro* and *in vivo* approach of influenza virus infection by simultaneous reduction of virus titre and cytokine expression through inhibition of virus-induced NF- $\kappa$ B and Raf-MEK-ERK activation. Inaugural Dissertation. Giessen. 1—10.
- Reading P. C., Miller J. L., Anders E. M. 2000. Involvement of the mannose receptor in infection of macrophages by influenza virus. *J. Virol.* 74 : 5190—5197.
- Roberts P. C., Compans R. W. 1998. Host cell dependence of viral morphology. *PNAS.* 95 : 5746—5751.
- Shaw M., Stone K. L., Colangelo C. M., Guiltice E. E., Palese P. 2008. Cellular proteins in influenza virus particles. *PLoS Pathogens.* 4 : e1000085.
- Sieczkarski S. B., Brown H. A., Whittaker G. R. 2003. Role of protein kinase C  $\beta$ II in influenza virus entry via late endosomes. *J. Virol.* 77 : 460—469.
- Sieczkarski S. B., Whittaker G. R. 2002. Influenza virus can enter and infect cells in the absence of clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.* 76 : 10455—10464.
- Sieczkarski S. B., Whittaker G. R. 2003. Differential requirements of Rab5 and Rab7 for endocytosis of influenza and other enveloped viruses. *Traffic.* 4 : 333—343.
- Simpson-Holley M., Ellis D., Fisher D., Elton D., McCauley J., Digard P. 2002. A functional link between the actin cytoskeleton and lipid rafts during budding of filamentous influenza virions. *Virology.* 301 : 212—225.
- Sun X., Whittaker G. R. 2007. Role of actin cytoskeleton during influenza virus internalization into polarized epithelial cells. *Cell Microbiol.* 9 : 1672—1682.
- Tyrell D. K. J., Norrby E. 1978. Structural polypeptides of measles virus. *J. Gen. Virol.* 39 : 219—229.
- Upham J. P., Pickett D., Irimura T., Anders E. M., Reading P. C. 2010. Macrophage receptors for influenza A virus: role of the macrophage galactose-type lectin and mannose receptor in viral entry. *J. Virol.* 84 : 3730—3737.
- Watanabe T., Watanabe S., Kawaoka Y. 2010. Cellular networks involved in influenza virus life cycle. *Cell Host and Microbe.* 7 : 427—439.
- Wu W. W., Panté N. 2009. The directionality of the nuclear transport of the influenza A genome is driven by selective exposure of nuclear localization sequences on nucleoprotein. *Virology.* 6 : 68—75.



## ROLE OF CELLULAR CYTOSKELETON IN INFLUENZA A INFECTION CYCLE

*T. D. Smirnova, D. M. Danilenko, A. V. Slita*

Research Institute of Influenza, Ministry of Health and Social Development of Russian Federation, St. Petersburg;  
e-mail: cellcultures@influenza.spb.ru

Influenza remains a significant social threat especially regarding the emergence of new mutant or reassortant strains. Measures of prophylaxis do not provide complete and stable protection from infection and the use of antivirals results in high-level occurrence of resistant forms of viruses. Nowadays more and more attention is paid to find new targets for antiviral therapy that are not directly connected with virus proteins but can act indirectly through cellular mechanisms involved in viral replication. This approach requires complete understanding of various cellular pathways used by influenza virus. Here we present a brief overview of interactions between influenza A virus and the cell cytoskeleton. This interaction is initiated from the very beginning of influenza infection — adsorption — and continues with endocytosis, release of viral RNP and its entry into the nucleus. The role of cytoskeleton during the late stages of infection is also of great importance. It takes part in NP translocation from the nucleus to the cytoplasm, virus assembly and budding. The presence of cellular actin in certain influenza virions is therefore not accidental but reflects the peculiarities of interaction between a virus and a host cell.

Key words: influenza virus, cell, cytoskeleton, endocytosis, budding.

---