

自体吞噬——II型程序性死亡

张松龄 唐宏*

(中国科学院生物物理研究所感染与免疫中心, 北京 100101)

摘要 自体吞噬 (autophagy) 是广泛存在于真核细胞内的一种溶酶体依赖性的降解途径, 在饥饿的条件下, 它可以调节细胞内长寿命蛋白和细胞器的降解, 降解产物再被细胞重新利用. 因此自体吞噬在细胞发育、细胞免疫、组织重塑及对环境适应等方面有着十分重要的作用. 近来发现, 自体吞噬还参与降解病原微生物、抵御感染的过程, 称之为异噬. 对自体吞噬的分子机制和调节以及其在生理病理过程中的作用进行相应讨论.

关键词 自体吞噬, 自噬体, 溶酶体, Atg

学科分类号 Q251

autophagy一词来源于希腊语, auto指自身、phagy是吃的意思, 所以 autophagy意为自体吞噬^[1], 简称自噬. 自噬是细胞内的物质成分利用溶酶体被降解过程的统称, 它是真核细胞所特有的. 自噬被诱导后, 细胞开始在胞浆中形成 300~900 nm 大小的多层膜的液泡, 其中包裹着要被降解的物质. 随后液泡与溶酶体融合, 液泡中的底物在酸性环境和溶酶体酶的共同作用下被降解, 例如蛋白质被分解为氨基酸、核酸被分解为核苷酸等等. 细胞内的物质主要有两种降解途径, 一种通过蛋白酶体被降解, 另一种是通过自噬作用. 蛋白酶体主要降解胞内的短寿命蛋白, 而自噬则负责长寿命蛋白和一些细胞器^[2]的降解利用.

自噬是细胞对内外环境压力变化的一种反应, 在某些情况下自噬还可导致细胞死亡, 被认为是区别于细胞凋亡 (I型程序性死亡) 的另一种细胞程序性死亡形式 (II型程序性死亡)^[3]. 自噬现象最早是于 1962 年在电子显微镜下被观察到的. 近年来由于分子生物学、基因组学等实验手段的日臻完善, 尤其是酵母自噬突变株的产生, 使得自噬分子基础的研究有了很大的进展.

1 自噬的分类

根据底物进入溶酶体途径的不同可以将细胞中存在的自噬现象分为三种类型: 微自噬 (microautophagy)、巨自噬 (macroautophagy) 和分子伴侣介导的自噬 (chaperone-mediated autophagy). 巨自噬即通常所指的自噬, 胞质成分被一种非溶酶体来源的膜所包绕, 形成自噬体 (autophagosome) 或

自噬泡, 这种自噬体的膜有可能来源于预先形成的小的膜结构 (自噬体前体或自噬瓣儿). 形成的自噬体外膜进而与溶酶体融合成嵌合的双体细胞器, 进入溶酶体腔内的自噬体内膜很快就被降解, 这使得溶酶体水解酶可以接触内化的底物从而将其降解. 在微自噬中也发生相同的包绕过程, 但包绕底物的是自身发生内陷的溶酶体膜. 在分子伴侣介导的自噬中, 可溶性胞质蛋白选择性地结合于溶酶体膜表面的受体, 从而调节其向溶酶体腔隙的转运. 这种选择性依赖于对底物氨基酸序列中一种靶向信号的识别, 通常由胞质内的分子伴侣蛋白完成. 形成的伴侣蛋白-底物复合物结合于溶酶体膜的受体上, 再由腔内的二级伴侣蛋白对底物进行转运^[4]. 由于底物、细胞种类以及细胞状态等的差异, 许多自噬过程也有自己独特的命名. 例如 macropexophagy、micropexophagy 就是分别用来描述通过巨自噬、微自噬而进行的过氧化物酶体的降解.

2 自噬的分子机制

自噬现象的很多研究都是在酵母中进行的. 生物学家们从 20 世纪 90 年代开始利用酵母为模式来研究自噬, 到目前为止已经发现了二十余个与自噬有关的基因, 其中将近一半的基因在果蝇、线虫、哺乳动物等多细胞物种中都十分保守^[5]. 为了统一标准, 2003 年 Klionsky^[6]将这些基因统一命名为

* 通讯联系人.

Tel: 010-64888438, E-mail: hongtang@moon.ibp.ac.cn

收稿日期: 2005-05-31, 接受日期: 2005-07-31

Atg(AuTophagy), 用来代表自噬基因及其相对应的蛋白质. 对这些自噬蛋白和基因的研究阐明了它们之间的相互作用以及它们在自噬过程中是如何发挥功能的.

2.1 自噬的诱导

细胞在受到外界条件的刺激(如饥饿、激素作用^[7]、低氧、高温)或在内部条件发生变化(如损伤或过多的细胞器和胞质成分积聚)的很多情况下都可以产生自噬. 雷帕霉素靶蛋白(Tor)作为细胞中氨基酸、ATP和激素的感受器,是调控细胞生长的关键因子之一^[8]. Tor在自噬的发生过程中主要是作为一种负调节剂,它一般通过两种机制发挥门控作用来抑制自噬现象. 一种机制是Tor作用于信号转导通路,通过激活下游的效应因子控制与自噬相关的基因转录和翻译;另一种机制是Tor直接或间接地引起Atg13的高磷酸化来抑制自噬的发生^[9]. 啤酒酵母中存在有一种特殊的选择性蛋白质传递途径——细胞质至滤泡传递途径(Cvt途径)^[10],它可以将细胞内的蛋白质选择性地运输到相应的亚细胞器中,例如溶酶体内固有的水解酶就是通过Cvt途径被运输到溶酶体内的. Cvt途径与自噬在形态学上十分相似都形成一种多层膜的液泡结构,而且它们还共用很多分子组分^[11]. 在不同的营养条件下细胞可以通过一种名为转换复合物(switching complex)的蛋白复合物实现自噬与Cvt途径之间的转换. Atg1是这种转换复合物中关键的组成成分,它是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶. 当细胞营养缺乏的时候(例如在饥饿的情况下),Atg1就会与Atg13结合从而诱导自噬的发生. Atg13的高磷酸化形式使得其与Atg1的亲合力减低从而抑制了自噬. 最新研究表明,Atg17在诱导自噬的过程中也有很重要的作用^[12],它可以与Atg13相互作用形成复合物结合并激活Atg1.

2.2 自噬体的形成

自噬起始于具有多层膜结构的自噬泡的形成. 形成自噬泡的膜来源问题是自噬研究领域中最了解最少并一直被关注的问题. 有的报道认为,自噬泡与遍布于内膜系统的其他液泡的形成方式不同,它并不是来自于事先存在的细胞器. 通过标记一些新鉴定的蛋白质,发现自噬与Cvt途径液泡形成的位点是一种称为前自噬体结构(PAS)的液泡前体,自噬体是以PAS为核心从头合成的^[13].

自噬与Cvt途径中已知的大部分蛋白质都是在自噬体的形成阶段起作用^[14]. 细胞内有两种泛素样

结合系统参与自噬体的形成,一种调节自噬蛋白Atg12-Atg5的结合,另一种负责Atg8和磷脂酰乙醇胺(PE)的共价连接^[15],它们使得孤立的自噬体前体膜连接形成完整的自噬体. 对酵母的研究发现,Atg5与Atg12在Atg7^[16]和Atg10的作用下可以相互连接. Atg7是泛素激活酶E1的同源体,当Atg7的一个重要的半胱氨酸被ATP激活后它可以与Atg12碳端的甘氨酸连接,同时Atg7末端的40个氨基酸又能促使自身二聚化. 接下来,Atg12被转移到Atg10的甘氨酸上,Atg10是一种E2酶,它能够将Atg12与Atg5内第149位的赖氨酸通过异肽键连接起来. 在体外培养的鼠胚胎干细胞中,Atg5参与自噬体的形成,Atg5和Atg12在人类的同源体也相互连接. 使用GFP标记的人Atg5已用来示踪自噬体的形成. Atg8是一种小蛋白质,它虽然不含有与泛素相近的氨基酸序列,但是它的三维结构包括一个泛素样折叠. Atg8在合成的时候其碳端含有一个精氨酸,合成后即被半胱氨酸酶Atg4所切割并暴露出甘氨酸,精氨酸被切除后的Atg8具备了形成硫酯键的活性,在Atg7^[17]、Atg3的共同作用下与PE连接. Atg8在哺乳动物中存在三种功能不尽相同的同源体:GABARAP、GATE-16和MAP-LC3,其中对MAP-LC3的研究比较详尽^[18]. MAP-LC3的脂质修饰形式位于自噬体的内膜和外膜,其与荧光蛋白形成融合蛋白后,很容易在细胞内定位,所以MAP-LC3通常被用作哺乳动物细胞中自噬膜的标记蛋白^[19]. 研究表明,抑制Tor的活性可以提高细胞内Atg8的含量,从而诱导自噬的发生.

2.3 自噬的调节

自噬作为一种重要的物质代谢方式,它的发生应该受到严格的调节和控制. 自噬体形成过程中所涉及的信号转导分子通过调节自噬相关基因的活性和表达来调控自噬. 在哺乳细胞中,自噬的调节因子包括蛋白激酶(如Tor, Erk1/2)、磷酸酶(如PP2A)、G蛋白、钙离子和脂激酶等等.

2.3.1 雷帕霉素靶蛋白(Tor2). 免疫抑制药物雷帕霉素与FK506结合蛋白形成的复合体可以抑制哺乳细胞和酵母细胞中Tor激酶的活性. Tor是控制细胞生长的一种蛋白激酶,通过抑制Tor2,雷帕霉素模拟了饥饿效应,导致大量细胞停滞在G0期,使自噬特异的蛋白磷酸化酶模式发生转换、自噬蛋白Atg8水平升高随即产生自噬.

2.3.2 三聚G蛋白. 有文献报道^[20],在HT-29细胞

中过量表达 G 蛋白异聚三体 $G_{\beta 3}$ 的 α 链可以诱导自噬的发生. 在缺乏氨基酸的条件下细胞内的 Erk1/2 MAP 激酶磷酸化, 磷酸化的 Erk1/2 MAP 又磷酸化 G_a 作用蛋白(GAIP)从而上调其活性. GAIP 可以增加 $G_{\beta 3}$ 自身 GTP 酶激活蛋白的活性促进 GTP 的水解, $G_{\beta 3}$ 蛋白的 GDP 结合形式有利于自噬的发生, 而结合了 GTP 的 $G_{\beta 3}$ 则使自噬现象减少.

2.3.3 磷酸肌醇三磷酸激酶(PI3K). PI3K 是催化膜磷酸肌醇肌糖基团 3' 端磷酸化的酶家族, 根据结构性亚基、底物特异性的不同可以将其分为 I 型、II 型、III 型. III 型 PI3K 催化底物形成 3- 磷酸磷脂酰肌醇(PI3p), 形成的产物可以促进自噬的发生. 在哺乳动物细胞内, PI3K 的抑制剂 wortmannin、LY294002 是自噬有效的抑制剂, 它们可以干扰鼠肝细胞内自噬体的形成. 选择型自噬的抑制剂 3- 甲基腺嘌呤通过抑制 III 型 PI3K 的活性起作用. 反义 RNA 导致 III 型 PI3K 活性的下降大大减少了 HT-29 细胞中自噬的发生. 在酵母细胞中, PI3K Vps34 是将细胞内的物质向溶酶体中进行运输的许多途径中的一种关键酶. III 型 PI3K 通过膜锚定 p150 接头分子与膜连接形成 Vps34(PI3K)/ Vps15 (p150) 异聚体, Vps34 与蛋白激酶 Vps15 以及辅助蛋白 Vps38 和 Vps30/Atg6 相互作用对羧肽酶 Y (CPY) 到溶酶体的转运至关重要(Cvt 途径), 而 Vps38 被 Atg14 替换后形成的复合体则是自噬发生所必要的. 在 Vps30/Atg6 缺陷型的酵母细胞中导入人类 Vps30/Atg6 的同源体 Beclin1 (Bcl-2 作用卷曲蛋白) 可以使自噬现象恢复. Beclin1 可能是一种肿瘤抑制因子, 向乳腺癌细胞系 MCF7 中导入 Beclin1 不仅可以恢复自噬现象而且还可以抑制肿瘤的发生和与癌细胞相关的其他恶性特征. 在 HeLa 细胞系中, 所有的 Beclin1 皆与 PI3K 活性相关. 大多数的 PI3K 与 Beclin1 的复合物都定位于反面高尔基网膜, Beclin1 的这种定位暗示 PI3p 可能作用于蛋白质向自噬性细胞器的分选过程而不是作为一种自噬调节因子.

3 自噬的生理学和病理学意义

3.1 细胞稳态和生理过程中的自噬^[21]

细胞的生长和稳态的维持是由受到严格控制的生物合成和代谢过程所调节的. 细胞需要一定的调节能力用以适应内外环境的变化和 / 或自身的发育. 因为自噬可以调控长寿蛋白和细胞器的降解利用, 参与细胞质的重建、维持细胞质的稳定, 所以

它在所有拥有溶酶体的细胞中都是十分必要的. 同时, 自噬还与某些组织特异性功能相关. 例如, 它参与 II 型肺泡细胞表面活性物质的生物合成, 在红细胞成熟过程中负责线粒体、核糖体的清除等等^[22]. 还有实验证明, 幼鼠出生后由于胎盘营养供应中断, 所以在获得乳汁所提供的营养前要面临一段十分严重的饥饿期, 新生的幼鼠就是通过诱导自噬来适应这种不利的环境变化的^[23]. 自噬在生理过程的作用大体可以分为三种: 参与发育和分化过程中机体的重新构建; 营养缺乏时产生氨基酸; 清除不需要的和损伤的细胞器与分子.

3.2 病理过程中的自噬^[21]

自噬途径的改变和自噬基因的突变与许多疾病的发生相关, 这些疾病包括肌病、神经退行性变、病原体感染、癌症等.

3.2.1 自噬和肌病. 临床发现一些病人肌细胞内胞质液泡的堆积可导致肌肉功能的改变, 新的自噬相关标志的应用表明这些病理改变与自噬相关. DANON 病是溶酶体相关膜蛋白 LAMP-2 缺失所引起的一种 X 连锁的空泡状心肌病和肌病. 在溶酶体蛋白 LAMP-2 敲除的小鼠体内, 肝脏、肌肉以及心肌细胞内有大量自噬泡的积聚, 这种小鼠可以作为 DANON 病的动物模型. 自噬泡积聚与甘露糖 -6- 磷酸受体在高尔基网膜中的循环相关, 这个结果说明 LAMP-2 很可能参与了甘露糖 -6- 磷酸受体的循环. 另一种以出生肌无力和早亡为特征的肌病也与自噬相关, 它是由于一种磷脂酰肌醇(PtdIns)磷酸酶的缺失导致的.

3.2.2 自噬和神经退行性变. 自噬可以清除积聚在内质网内外错误折叠的蛋白质, 然而过度的自噬却导致了一些退行性神经病变的病理改变. 在海丁顿、阿滋莫病^[24]中溶酶体系统的形态有极大的变化, 同时调节自噬的信号转导级联反应也产生改变, 使得海丁顿和淀粉前体蛋白突变体形成, 从而导致疾病的发生. 在帕金森综合症中病人的神经元内积聚有大量名为 Lewy 体的自噬泡, a-synuclein 是 Lewy 体的主要蛋白质, a-synuclein 的突变表达可以引起细胞内泛素蛋白酶系统的破坏并导致自噬泡的大量积聚, 使病人早期发病.

3.2.3 自噬和病原体感染. 自噬在细胞防御中的作用之一就是清除入侵的病原体. 尽管侵入细胞的细菌一般通过内吞被运送到溶酶体降解, 但还是有一些病原体可以通过阻碍或改变吞噬体的成熟而逃脱宿主的防御机制. 细菌在逃脱非吞噬细胞的内吞体

后可以被自噬体内化、降解从而减少了细胞内具有复制能力的病原体. 因此, 自噬能够保护机体免受细菌的侵袭^[25]. 然而, 还有一些细菌可以利用自噬这种机制进行复制. 这些细菌经内吞进入细胞后并不通过吞噬作用被清除而是进入了具有自噬体特征的双层膜结构内, 它们将自己隐蔽其中并破坏自噬途径. 宿主的防御机制对微生物施加了强大的进化压力从而使其获得相应的方法对抗宿主的清除机制, 但自噬到底有利于微生物复制还是有助于其被宿主清除还不是十分清楚^[26].

3.2.4 自噬和癌症. 自噬既可以诱导也可以防止癌症的发生, 它的作用在肿瘤的进展中不断地发生变化^[27]. 自噬可以作为肿瘤的一种抑制因子, 对自噬的抑制可导致原癌细胞持续增殖. 但在肿瘤生长过程中, 尤其是当肿瘤内还没有形成足够的血管为其扩增提供营养时, 癌细胞就是通过自噬来克服营养缺乏和低氧的环境得以生存的. 而且, 自噬还可以保护一些癌细胞免受电离辐射的作用, 它可以清除电离辐射时受损的大分子或细胞器(如线粒体), 从而使细胞免于凋亡而存活下来.

3.3 自噬与衰老

几乎所有的衰老组织都存在溶酶体系统形态学的改变和酶的变化. 随着年龄的增长, 细胞内至少有两种自噬(巨自噬和伴随性自噬)作用开始减弱. 根据自噬的生理功能可以很容易推断出这种衰减作用对细胞所产生的影响, 例如损伤的细胞结构不能有效地被清除、细胞稳态发生变化、细胞适应外界环境和自身防御反应的能力降低等等. 目前对自噬与衰老的关系研究主要集中在年龄依赖性自噬的分子机制上. 维持正常的自噬功能还与长寿相关. 有实验表明在生命早期即对摄入能量进行限制(一种减缓衰老的干预方法)的高龄鼠体内, 巨自噬的水平与调节与年轻的老鼠十分相似, 最近还首次在线虫中发现了自噬与长寿的相关性, 这更是为自噬和衰老有关提供了相应的基因学证据^[28].

4 结 语

早在 20 世纪 70 年代, 诺贝尔生理医学奖得主 Christian de Duve 就预告了细胞自噬对动物生理的重要性. 从最初自噬的发现到现在虽然已经有将近 50 年的历史, 但自噬相关领域的很多研究才刚刚开始, 有关自噬的很多问题都没有得到很好的解释和解决^[29], 如自噬体膜的来源、自噬的调节机制、自噬与程序性死亡^[30]的关系等等. 由于自噬在细胞

生长发育和稳态维持中以及其在病理生理过程中的重要作用, 对自噬进一步探讨研究将具有十分重要的意义和非常广阔的前景.

参 考 文 献

- 1 Levine B, Klionsky D J. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*, 2004, **6** (4): 463~477
- 2 Farre J C, Subramani S. Peroxisome turnover by micropexophagy: an autophagy-related process. *Trends Cell Biol*, 2004, **14** (9): 515~523
- 3 Bras M, Queenan B, Susin S A. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. *Biochemistry (Mosc)*, 2005, **70** (2): 231~239
- 4 Majeski A E, Dice J F. Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, **36** (12): 2435~2444
- 5 Klionsky D J. Cell biology: regulated self-cannibalism. *Nature*, 2004, **431** (7004): 31~32
- 6 Klionsky D J, Cregg J M, Dunn W A Jr, *et al.* A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell*, 2003, **5** (4): 539~545
- 7 Lum J J, Dauer D E, Kong M, *et al.* Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell*, 2005, **120** (2): 237~248
- 8 Schmelzle T, Hall M N. TOR, a central controller of cell growth. *Cell*, 2000, **103** (2): 253~262
- 9 Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T, *et al.* Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol*, 2000, **150** (6): 1507~1513
- 10 Shintani T, Klionsky D J. Cargo proteins facilitate the formation of transport vesicles in the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J Biol Chem*, 2004, **279** (29): 29889~29894
- 11 Reggiori F, Wang C W, Nair U, *et al.* Early stages of the secretory pathway, but not endosomes, are required for Cvt vesicle and autophagosome assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 2004, **15**(5): 2189~2204
- 12 Kabeya Y, Kamada Y, Bada M, *et al.* Atg17 functions in cooperation with atg1 and atg13 in yeast autophagy. *Mol Biol Cell*, 2005, **16** (5): 2544~2553
- 13 Noda T, Suzuki K, Ohsumi Y. Yeast autophagosomes: de novo formation of a membrane structure. *Trends Cell Biol*, 2002, **12** (5): 231~235
- 14 Klionsky D J. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J Cell Sci*, 2005, **118** (Pt 1): 7~18
- 15 Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, *et al.* A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*, 2000, **408** (6811): 488~492
- 16 Tanida I, Mizushima N, Kiyooka M, *et al.* Apg7p/Cvt2p: A novel protein-activating enzyme essential for autophagy. *Mol Biol Cell*, 1999, **10** (5): 1367~1379
- 17 Komatsu M, Waguri S, Ueno T, *et al.* Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol*, 2005, **169** (3): 425~434

- 18 Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, **36** (12): 2503~2518
- 19 Mizushima N. Methods for monitoring autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, **36** (12): 2491~2502
- 20 Pattingre S, Petiot A, Codogno P. Analyses of Galpha-interacting protein and activator of G-protein-signaling-3 functions in macroautophagy. *Methods Enzymol*, 2004, **390**: 17~31
- 21 Shintani T, Klionsky D J. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science*, 2004, **306** (5698): 990~995
- 22 Meijer A J, Codogno P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, **36** (12): 2445~2462
- 23 Kuma A, Hatano M, Matsui M, *et al.* The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature*, 2004, **432** (7020): 1032~1036
- 24 Nixon R A, Wegiel J, Kumar A, *et al.* Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2005, **64** (2): 113~122
- 25 Levine B. Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense. *Cell*, 2005, **120** (2): 159~162
- 26 Kirkegaard K, Taylor M P, Jackson W T. Cellular autophagy: surrender, avoidance and subversion by microorganisms. *Nat Rev Microbiol*, 2004, **2** (4): 301~314
- 27 Edinger A L, Thompson C B. Defective autophagy leads to cancer. *Cancer Cell*, 2003, **4** (6): 422~424
- 28 Melendez A, Tallocazy Z, Seaman M, *et al.* Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*. *Science*, 2003, **301**(5638): 1387~1391
- 29 Klionsky D J. Autophagy. *Curr Biol*, 2005, **15** (8): R282~283
- 30 Edinger A L, Thompson C B. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol*, 2004, **16** (6): 663~669

Autophagy: Type II Programmed Cell Death

ZHANG Song-Ling, TANG Hong*

(Center of Infection and Immunity, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract Autophagy (eating oneself) is the lysosomal degradation of cytosolic components, usually the long-lived proteins and organelles, and recycle the digested food for cellular metabolism during starvation. Hence, autophagy is functionally involved in cell development, immunity, tissue remodeling and cell adaptation to the adversary circumstances. Recently it suggests that autophagic machinery plays a critical role in protecting eukaryotes from infection of microbial infections, the process called xenophagy. The genetic basis of the intracellular digestion was highlighted, and physiological and pathophysiological regulation of autophagy is discussed.

Key words autophagy, autophagosome, lysosome, Atg

*Corresponding author. Tel: 86-10-64888438, E-mail: hongtang@moon.ibp.ac.cn

Received: May 31, 2005 Accepted: July 31, 2005