

研究报告

Ap5A 延迟 TRAIL 诱导 Novikoff 细胞的凋亡*

赖秋安¹⁾ 刘彦信²⁾ 郝雪梅¹⁾ 唐爱辉¹⁾ 卫威¹⁾ 王世强¹⁾ 孙久荣^{1)**}(¹⁾北京大学生命科学学院, 北京 100871; ²⁾中国医学科学院基础医学研究所, 北京 100005)

摘要 通过荧光分子标记和 CONFOCAL 技术检测方法, 建立了 TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand, 一种肿瘤坏死因子) 诱导 Novikoff 细胞凋亡的模型, 并探讨了 TRAIL 诱导凋亡的机制和 Ap5A (P¹, P⁵-Di (adenosine 5') pentaphosphate) 在其中的作用. 结果显示: TRAIL 可诱导 Novikoff 细胞凋亡, 且具有剂量和时间依赖性, 同时胞内钙离子浓度显著上调. Ap5A 能延迟 TRAIL 诱导的 Novikoff 细胞凋亡, 同时下调胞内钙离子浓度. TRAIL 和 Ap5A 分别上调和下调胞内钙离子浓度的作用可能是其诱发和延迟 Novikoff 细胞凋亡的一个机制.

关键词 凋亡, TRAIL, Ap5A, 钙离子

学科分类号 Q291

肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体 (TNF-related apoptosis inducing ligand, TRAIL) 是 1995 年由 Wiley 等克隆的肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 家族成员. 它具有选择性诱导肿瘤细胞凋亡的特性, 但其在胞内的信息传递途径尚不明确^[1~3]. Novikoff 细胞系是 1957 年由 Novikoff 建立的小鼠肝肿瘤细胞, 是细胞和分子生物学研究的良好模型, 但作为细胞凋亡模型的研究尚未见报道^[4,5]. Ap5A 是 P¹, P⁵-Di (adenosine 5') pentaphosphate 的简称, 属双腺苷多磷酸盐 (diadenosine polyphosphates) 家族的成员, 是腺苷酸激酶 (adenylate kinase, AK) 的特异性抑制剂^[6]. 由于 AK 与细胞色素 c 的共释放是细胞凋亡中的一种普遍现象^[7,8]. 作为 AK 的特异性抑制剂, Ap5A 是否有抑制细胞凋亡的作用? 有报道 Ap5A 能导致胞内 Ca²⁺ 浓度的急剧上升^[9,10]. 这是否意味 Ap5A 有促进细胞凋亡的作用? 因为作为胞内信息传递的第三信使, Ca²⁺ 浓度的增加将激活各种 Ca²⁺ 依赖性酶和凋亡蛋白, 继而经一系列级联反应促进细胞凋亡的程序^[11]. 为此, 本工作建立了 TRAIL 诱导 Novikoff 细胞凋亡模型, 进一步探讨 TRAIL 诱导细胞凋亡的机理和 Ap5A 在细胞凋亡中的作用.

1 材料和方法

1.1 试剂

细胞核荧光染料 PI、DAPI 和线粒体荧光染料 Rhodamine 123、Ap5A 等均购自美国 Sigma 公司, Ca²⁺ 分子探针 Fluor-4 及其配制液二甲基亚酚

(DMSO)、F-127 等均购自美国 Molecular Probes Eugene Oregon 公司, DNA ladder 提取及鉴定试剂盒购自博大泰克生物制剂公司 (BioDev-Tech.), TRAIL 基因重组产物^[12] 由中国医院科学院基础医学研究所医学分子生物学国家重点实验室刘彦信教授提供.

1.2 实验细胞系和培养方法

将 Novikoff 细胞株 (北京大学膜生物国家重点实验室从美国 Minnesota 大学引进的一种肿瘤细胞株) 在 37℃ 恒温摇床上进行悬浮培养, 培养液为 Swim 77 Medium^[13], 转速 60~70 r/min. 在此条件下约每 12 小时细胞数量增加一倍, 在 12~14 h 呈指数增长, 最终达到对数生长. 每 24 小时换培养液一次, 每 7 天换瓶一次.

1.3 荧光染色及显微照相

单染细胞核时, 在载玻片上迅速用 3% 戊二醛固定细胞, 加 1 mg/L 4, 6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) 特异性染细胞核 (三者体积比为 1:1:1), 指甲油封片, 置于 OLYMPUS BH-2 荧光显微镜下观察细胞核的形态学变化并显微拍照 (UV 镜头). 在载玻片上同时用 100 mg/L 碘化丙啶 (PI) 和 10 mg/L Rhodamine 123 双染细胞核与线粒体 (三者体积比为 1:1:2), 指甲油封片, 用 CONFOCAL-TCS4D Leica 对不同生长时期的细胞进行照相, PI

* 国家自然科学基金资助项目 (1999053905).

** 通讯联系人.

Tel: 010-62752871, Fax: 010-62751526

E-mail: sjr@pku.edu.cn

收稿日期: 2003-01-29, 接受日期: 2003-02-26

的激发波长为 568 nm (中国科学院动物研究所生殖生理实验室).

1.4 DNA 提取及琼脂糖凝胶电泳

采用经典的 DNA Ladder 检测法^[14], 结果直接扫描入电脑.

1.5 胞内 Ca^{2+} 水平的检测

细胞贴壁后用 Fluor-4 染色 13 min, 用 CONFOCAL-Zeiss LSM 510 记录细胞内的荧光强度, 激发波长为 448 nm (北京大学生物膜与膜生物工程国家重点实验室). 将不同时间群体细胞的荧光强度通过上述系统换算成不同时间单个细胞胞内的 Ca^{2+} 浓度, 并作出浓度变化曲线.

1.6 结果统计

数据的统计采用 Microsoft Excel, 作图采用 Prism 3.0 软件, 误差分析用 STATISTICA 软件中的双因素方差分析 ANOVA/MANOVA.

2 结 果

2.1 TRAIL 诱导 Novikoff 细胞凋亡

2.1.1 TRAIL 诱导 Novikoff 细胞凋亡的形态学观察: 从细胞形态学的角度观察到 TRAIL 诱导 Novikoff 细胞凋亡. 如图 1 所示, TRAIL 导致细胞核相继出现了染色质不规则凝集、边缘化、裂解和凋亡小体的形成等细胞凋亡的特异性形态学变化.

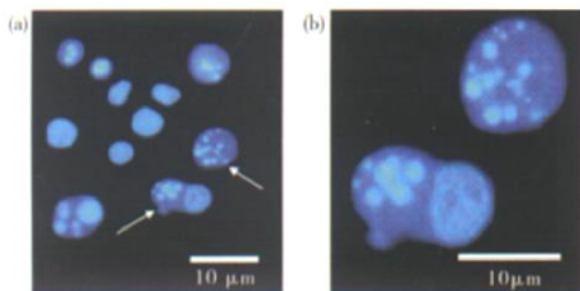


Fig. 1 Morphological observation of Novikoff cell apoptosis induced by TRAIL

After incubated with TRAIL (20 mg/L) at 37 °C for 2 h, the Novikoff cells were dyed by DAPI and observed under fluoromicroscope. (b) is a part of (a).

用不同浓度 (5、10、20、40 和 60 mg/L) 的 TRAIL 分别作用于 Novikoff 悬浮细胞, 均在 2 h 后取样, 以细胞出现凋亡小体为标记, 观测 TRAIL 诱导 Novikoff 细胞凋亡的量效关系 ($n=8$). 表 1 所示, 随着 TRAIL 浓度的增加, 细胞凋亡百分比也逐渐上升, 说明 TRAIL 诱导 Novikoff 细胞凋亡存在量效关系. 从剂量的有效性考虑, 本工作选择浓度为 20 mg/L TRAIL 作进一步诱导

Novikoff 凋亡的研究.

Table 1 The percentage of Novikoff cell apoptosis induced by TRAIL

TRAIL/ (mg·L ⁻¹)	Apoptosis/ %
0	2.50 ± 1.67
5	13.39 ± 2.62
10	22.97 ± 2.76
20	32.07 ± 2.55
40	41.66 ± 2.04
60	50.12 ± 3.12

$n=8, \bar{x} \pm s.$

2.1.2 凋亡过程中细胞核和线粒体形态学变化的同步观测: 用 100 mg/L PI 和 10 mg/L Rhodaming123 双染细胞核与线粒体, 通过荧光显微镜可同步看到凋亡过程中细胞核 (红色) 与线粒体 (绿色) 二者形态学变化的动态过程 (图 2). 在 TRAIL 作用下, 线粒体质地致密化, 排列更紧凑, 趋向肿大; 同时伴有染色质的凝集、边缘化、裂解和凋亡小体的出现.

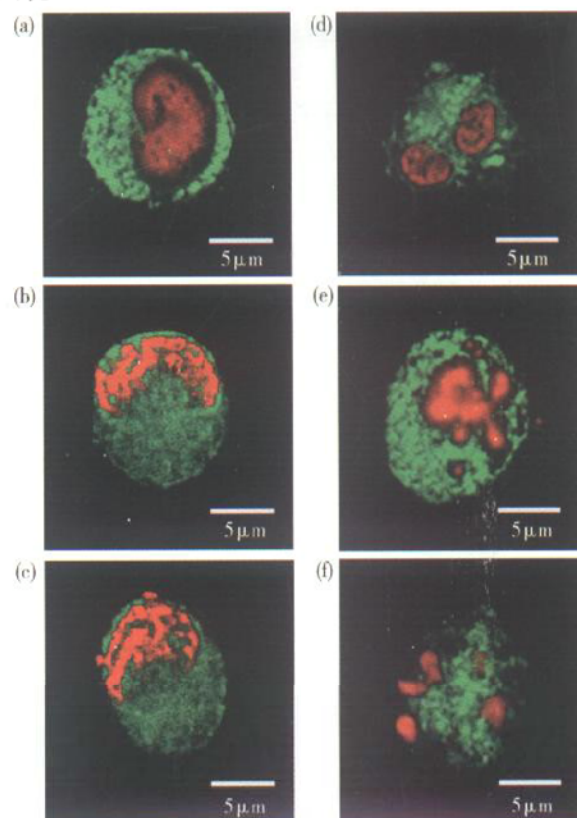


Fig. 2 Morphological changes of the nuclear (red) and mitochondrial (green) in apoptosis cells

Novikoff cells were induced by TRAIL (20 mg/L) and mitochondria were dyed by Rhodaming 123 during different intervals. Nuclei were dyed by PI. The changes of them were both observed by CONFOCAL.

(a) 0 min, (b) 20 min, (c) 30 min, (d) 1 h, (e) 2 h, (f) 3 h.

2.1.3 TRAIL 诱导 Novikoff 细胞凋亡的分子生物学检测: DNA 裂解 (DNA Ladder) 是检测细胞凋亡的经典方法. 如图 3 所示, 20 mg/L TRAIL 处理细胞 2 h 后出现明显的 DNA-Ladder, 5 mg/L TRAIL 处理的细胞未出现 DNA-Ladder.

2.2 Ap5A 延迟 TRAIL 诱导的凋亡效应

2.2.1 Ap5A 延迟凋亡效应的细胞学观测: TRAIL 和 Ap5A 同时作用于 Novikoff 细胞与 TRAIL 和 Ap5A 分别作用的效果不同. 如表 2 所示, 对照组与单独 Ap5A 之间不存在显著性差异 ($P > 0.05$), 说明单独 Ap5A 不能导致凋亡的发生, 4 个给药组 (TRAIL 和 3 组加 Ap5A TRAIL) 之间两两比较, 均存在显著性差异 ($P < 0.01$), 说明 Ap5A 对 TRAIL 诱导的凋亡延长效应具有剂量依赖性, Ap5A 浓度越高, 延迟效应越明显.

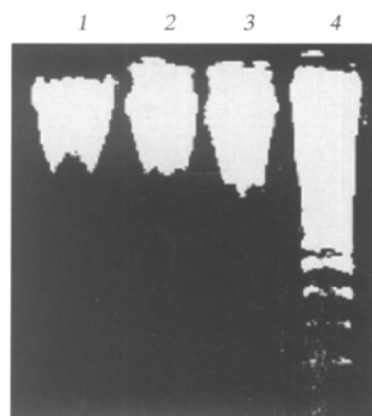


Fig. 3 Effects of TRAIL in different concentrations on DNA electrophoresis of Novikoff cells

1: Control (2 h), 2: 5 mg/L TRAIL (2 h), 3: 20 mg/L TRAIL (1 h), 4: 20 mg/L TRAIL (2 h).

Table 2 The effect of Ap5A delaying apoptosis of Novikoff cell induced by TRAIL

Group	The percentage of Novikoff apoptosis/ %					
	0.5 h	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h
Control group	1.59 ± 1.49	2.30 ± 1.65	3.10 ± 1.73	2.64 ± 2.05	3.53 ± 1.89	3.01 ± 1.83
Ap5A(300 mg/L)	2.61 ± 2.06	3.23 ± 1.89	2.97 ± 1.53	3.54 ± 1.85	3.82 ± 2.05	4.10 ± 1.91
TRAIL(20 mg/L)	10.24 ± 2.84	19.34 ± 2.89	31.54 ± 3.69	47.35 ± 3.24	55.46 ± 5.01	64.41 ± 4.90
TRAIL(20 mg/L) + Ap5A(100 mg/L)	9.39 ± 2.43	17.82 ± 1.98	28.61 ± 3.56	38.27 ± 3.57	48.10 ± 4.03	58.47 ± 4.33
TRAIL(20 mg/L) + Ap5A(300 mg/L)	8.81 ± 2.16	15.49 ± 2.30	24.39 ± 2.61	34.12 ± 3.16	42.38 ± 2.68	51.68 ± 3.51
TRAIL(20 mg/L) + Ap5A(500 mg/L)	8.45 ± 1.78	13.05 ± 2.21	18.03 ± 2.85	23.55 ± 2.13	31.59 ± 3.28	37.32 ± 4.37

$n = 8, \bar{x} \pm s.$

2.2.2 Ap5A 延迟凋亡效应的分子生物学观测: 将 500 mg/L Ap5A 与 20 mg/L TRAIL 共同作用下的 Novikoff 细胞作 DNA 琼脂糖凝胶电泳时, 发现

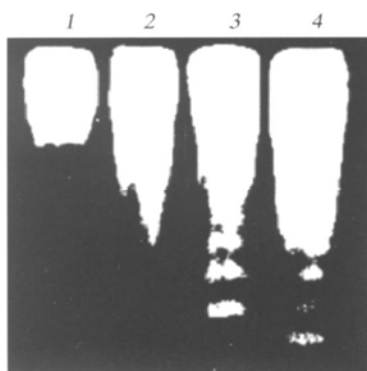


Fig. 4 Effected of both TRAIL and Ap5a on DNA electrophoresis of Novikoff cells

The concentration of TRAIL is 20 mg/L and the concentration of Ap5A is 500 mg/L. 1: Ap5A (2 h), 2: Ap5A+ TRAIL (2 h), 3: Ap5A + TRAIL (3 h), 4: Ap5A+ TRAIL (4 h).

作用 2 h 并未出现如前 TRAIL 单独作用时的 DNA Ladder, 作用 3 h 后才开始出现 DNA Ladder, 4 h 后出现明显的 DNA Ladder (图 4).

2.3 Ca^{2+} 参与 TRAIL 和 Ap5A 的作用机制

图 5 为给药前后 Novikoff 细胞荧光强度的相对变化. 与对照组相比: a. TRAIL (20 mg/L) 作用 30 min 后胞内 Ca^{2+} 浓度显著上升, 1 h 后达到最大值 ($P < 0.05$), 表明 Ca^{2+} 可能参与 TRAIL 诱导的 Novikoff 细胞凋亡; b. 单独 Ap5A (500 mg/L) 导致了 Novikoff 胞内钙浓度的降低 ($P < 0.05$); c. TRAIL (20 mg/L) 与 Ap5A (500 mg/L) 共同作用时 Novikoff 胞内 Ca^{2+} 浓度几乎没有变化 ($P > 0.05$). 这启示 Ap5A 对胞内 Ca^{2+} 浓度的负调节作用可能是其延迟 TRAIL 诱导 Novikoff 凋亡的机制之一. 此外, 结果还显示, 在很短时间内 (30~60 min) 胞内 Ca^{2+} 水平就显著上升, 而此时的细

胞核仍完好无损, 未见凋亡小体出现, 只可看到少数细胞染色质的浓缩现象. 这说明在时间上, 胞内 Ca^{2+} 水平上升是细胞凋亡级联反应中的一个上游事件.

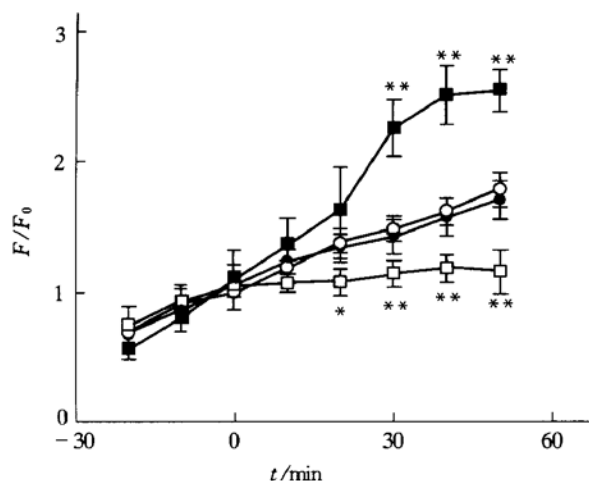


Fig. 5 Effects of TRAIL and Ap5A on the intracellular calcium concentration of Novikoff cells

F/F_0 : the relative changes of the intracellular calcium concentration of Novikoff cells after treated with TRAIL and Ap5A. Ap5A: 500 mg/L; Control: saline group; F_0 : the value of instantaneous the concentration of calcium in cells before treated with TRAIL and Ap5A; F : the value after the treat; TRAIL: treated with 20 mg/L; TRAIL and Ap5A: treated with TRAIL 20 mg/L and Ap5A 500 mg/L. $n = 4$. ●—●: control; ■—■: TRAIL; ○—○: TRAIL and Ap5A; □—□: Ap5A.

3 讨 论

线粒体在细胞生命活动中具有重要作用, 被喻为“细胞的生命之火”. 同样, 线粒体在细胞凋亡过程中也具有重要作用. 细胞凋亡中线粒体的结构和功能发生改变. 但线粒体的变化是细胞凋亡的因还是果? 本工作试图从形态学变化时间先后, 推测线粒体和细胞核在细胞凋亡过程中的前后或因果关系, 但仅就本实验尚不能定论, 因为在 TRAIL 诱导 Novikoff 细胞凋亡过程中线粒体和细胞核的形态学变化是伴行的.

由于 TRAIL 选择性杀死肿瘤细胞的特性, 以及由此而产生的作为抗肿瘤制剂的潜能, 使得 TRAIL 诱导细胞凋亡机制的研究变得意义重大. 大量研究发现胞内 Ca^{2+} 稳态失调是细胞凋亡中的一个保守生化事件. 但 Ca^{2+} 是否参与 TRAIL 诱导细胞凋亡的信号传导罕有报道^[15, 16]. 作为胞内重要信使的 Ca^{2+} 是否参与 TRAIL 诱导的细胞凋亡? 本实验证实, 在 TRAIL 处理 Novikoff 细胞 30 min 后, 胞内 Ca^{2+} 浓度明显上升, 而此时的细胞核尚

完好无损, 既无边缘化亦无裂解. DNA 电泳实验也证实 DNA Ladder 出现在给药后 2 h. 这都说明至少胞内 Ca^{2+} 浓度的上升早于凋亡中细胞核的片段化, 属于凋亡发生后的上游事件. 当 Ap5A 抑制了胞内 Ca^{2+} 水平升高时, 凋亡也被延迟. 这也表明 Ca^{2+} 参与了 TRAIL 诱导的 Novikoff 细胞凋亡, 并可能是 TRAIL 诱导凋亡的一条途径.

英国的一个研究小组首先报道了 Ap5A 与细胞凋亡的关系. 他们发现 Ap5A 能延迟中性白细胞的凋亡, 但对其机制没有进一步报道^[17]. 本工作发现, Ap5A 能延迟 TRAIL 诱导的 Novikoff 细胞凋亡, 且这种延迟效应具有剂量依赖性. Ap5A 不仅能降低胞内 Ca^{2+} 水平, 还显著减弱 TRAIL 引起的胞内 Ca^{2+} 水平的上升. 由于胞内 Ca^{2+} 水平上升是凋亡过程中普遍的生化现象. Ap5A 对胞内 Ca^{2+} 的下调作用与细胞凋亡的延迟, 二者之间的对应关系值得进一步探讨. 胞内 Ca^{2+} 水平的上升将激活很多 Ca^{2+} 依赖酶, 它们的级联反应最终导致了细胞凋亡的发生. 因此这种 Ca^{2+} 负调节作用可能直接导致了 Ca^{2+} 依赖的凋亡延迟.

细胞膜上 Ap5A 的受体有 P2X 和 P2Y 两类, 其中 P2X 为离子通道型受体, P2Y 为 G 蛋白耦联受体^[18]. 这两种受体在膜上的分布具有细胞差异性, 不同细胞中受体的种类和数量不同. 许多文献报道, P2X 受体的开放可导致 Ca^{2+} 快速内流, 胞内 Ca^{2+} 水平在瞬间 (一般在几分钟之内) 上升^[19, 20]. 本实验观察到 Ap5A 导致胞内 Ca^{2+} 水平持续下降, 并拮抗凋亡过程中 TRAIL 所导致的胞内 Ca^{2+} 水平上调. 这两个过程持续的时间都较长 (20~ 60 min), 这不可能是 P2X 受体的作用, 可能是 P2Y 受体的激活.

细胞质中增加的 Ca^{2+} 是来自胞外 Ca^{2+} 的内流还是胞内内质网 Ca^{2+} 库的释放, 或二者共同作用的结果? 如果是胞外 Ca^{2+} 的跨膜内流, 那么 TRAIL 是否是通过与膜上受体结合后而导致膜上 Ca^{2+} 离子通道的开放? 如果是胞浆 Ca^{2+} 库的释放, 是否与三磷酸肌醇 (inositol (1, 4, 5)-trisphosphate, IP_3) 相关? IP_3 为胞内 Ca^{2+} 激动剂促进内质网释放 Ca^{2+} 进入胞浆. 这些将是我们进一步研究的问题. 进一步研究 TRAIL 诱导细胞凋亡的分子机制对其最终走向临床应用具有重要意义.

参 考 文 献

- 1 Wiley S R, Schooley K, Smolak P J, *et al.* Identification and

- characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*, 1995, **3** (6): 673~ 682
- 2 Robert M P, Scot A M, Siegfried R, *et al.* Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem*, 1996, **271** (22): 12687~ 12690
 - 3 Mariani S M, Krammer P H. Differential regulation of TRAIL and CD95 ligand in transformed cells of the T and B lymphocyte lineage. *Eur J Immunol*, 1998, **28** (3): 973~ 982
 - 4 Meyer R, Malewicz B, Baumann W J, *et al.* Increased gap junction assembly between cultured cells upon cholesterol supplementation. *J Cell Sci*, 1990, **96** (Pt 2): 231~ 238
 - 5 Sheid B. Deoxycytidylate aminohydrolase activity in the Novikoff hepatoma is dependent on the localization of the tumor. *Oncology*, 1990, **7** (3): 278~ 281
 - 6 Lienhard G E, Secemski I I. P₁, P₅-Di (adenosine-5') pentaphosphate, a potent multisubstrate inhibitor of adenylate kinase. *J Biol Chem*, 1973, **248** (3): 1121~ 1123
 - 7 Single B, Leist M, Nicotera P. Simultaneous release of adenylate kinase and cytochrome c in cell death. *Cell Death Differentiation*, 1998, **5** (12): 1001~ 1003
 - 8 Masaaki N, Mamoru Y, Shaochun S, *et al.* Mechanism of mitochondrial import of adenylate kinase isozymes. *J Biochem*, 1998, **123**: 128~ 135
 - 9 Holden C P, Haughey N J, Dolhun B, *et al.* Diadenosine pentaphosphate increases levels of intracellular calcium in astrocytes by a mechanism involving release from caffeine/ryanodine- and IP₃-sensitive stores. *J Neurosci Res*, 2000, **59** (2): 276~ 282
 - 10 Tepel M, Heidenreich S, Schluter H, *et al.* Diadenosine polyphosphates induce transplasma membrane calcium influx in cultured glomerular mesangial cells. *Eur J Clin Invest*, 1996, **26** (12): 1077~ 1084
 - 11 Krebs J. The role of calcium in apoptosis. *Biometals*, 1998, **11** (4): 375~ 382
 - 12 Liu Y X, Zhu X, Ma Z Y, *et al.* Expression, purification and biological activity of rsTRAIL in *E. coli*. *Chin Sci Bulletin*, 1999, **44** (14): 1306~ 1309
 - 13 Mazurek S, Grimm H, Wilker S, *et al.* Metabolic characteristics of different malignant cancer cell lines. *Anticancer Res*, 1998, **18** (5A): 3275~ 3282
 - 14 Cohen G M, Sun X M, Snowden R T, *et al.* Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. *Biochemical J*, 1992, **286** (2): 331~ 334
 - 15 Keane M M, Ettenberg S A, Nau M M, *et al.* Chemotherapy augments TRAIL-induced apoptosis in breast cell lines. *Cancer Research*, 1999, **59** (3): 734~ 741
 - 16 Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan A M, *et al.* The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science*, 1997, **276** (5309): 111~ 113
 - 17 Gasmil L, McLennan A G, Edwards S W. Neutrophil apoptosis is delayed by the diadenosine polyphosphates, Ap5A and Ap6A: synergism with granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *Br J Haematology*, 1996, **95** (4): 637~ 639
 - 18 Pintor J, King B F, Miras-Portugal M T, *et al.* Selectivity and activity of adenine dinucleotides at recombinant P2X₂ and P2Y₁ purinoceptors. *Br J Pharmacol*, 1996, **119** (5): 1006~ 1012
 - 19 Tepel M, Lowe S, Nofer J R, *et al.* Diadenosine polyphosphates regulate cytosolic calcium in human fibroblast cells by interaction with P2x purinoceptors coupled to phospholipase C. *Biochim Biophys Acta*, 1996, **1312** (2): 145~ 150
 - 20 Gabriels G, Endlich K, Rahn K H, *et al.* *In vivo* effects of diadenosine polyphosphates on rat renal microcirculation. *Kidney Int*, 2000, **57** (6): 2476~ 2484

P¹, P⁵-Di (adenosine 5') pentaphosphate (AP5A) Retards TRAIL-induced Apoptosis in Novikoff Cells*

LAI Qir-An¹⁾, LIU Yarr-Xin²⁾, HAO Xue-Mei¹⁾,
TANG Aihui¹⁾, Wei Wei¹⁾, WANG Shiqiang, Sun Jiarong**

(¹⁾ College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China;

²⁾ Institution of Basic Medical Sciences, Chinese Academic of Medical Sciences, Beijing 100005, China)

Abstract A novel model of TRAIL-induced apoptosis of Novikoff cells was constructed based on the observation using molecular fluorescence labelling and confocal microscopic techniques. The mechanism of TRAIL-induced apoptosis and the role of Ap5A [P¹, P⁵-Di (adenosine-5') pentaphosphate] during this process was investigated. The results revealed that: 1) TRAIL-induced apoptosis is both dosage- and time- dependent, which correlates with the remarkable increase of [Ca²⁺] in Novikoff cells; 2) Ap5A retards the TRAIL-induced apoptosis as well as down-regulates [Ca²⁺] in Novikoff cells. These observations indicate that the mechanism of TRAIL-induced apoptosis and Ap5A retards it through down and up-regulating intracellular calcium concentration respectively.

Key words apoptosis, TRAIL, Ap5A, Ca²⁺

* This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (1999053905).

** Corresponding author. Tel: 86-21-62752871, Fax: 86-21-62751526, E-mail: sjr@pku.edu.cn

Received: January 29, 2003 Accepted: February 26, 2003