

oder nicht-reduzierendem (unten) SDS-PAGE aufgetrennt. Im Western Blot wurde versucht, unterschiedliche ζ -Formen mit einem Hamster anti- ζ 146-968 mAb (1: 500) nachzuweisen. Entwickelt wurde mit Ziege anti-Hamster (1: 5000) und dem ECL-System. Im Falle der Gesamtlysate wurden 6×10^5 T-Zellen pro Bahn aufgetragen, bei den Präzipitationen 2×10^7 . Die Pervanadat (PV)-Stimulation erfolgte mit in Suspension befindlichen Zellen.

Abb. 14b zeigt die Wiederholung dieses Versuchs und die Analyse unter nicht-reduzierenden Bedingungen. Die höher molekulare ζ -Form, die nach Hyperphosphorylierung entsteht, ließ sich nach der sehr starken Phosphorylierung durch Pervanadat sowohl im Gesamtzellysate als auch im Präzipitat nachweisen. Nach der im Vergleich zu Pervanadat schwächeren TZR-Stimulation ist die höher molekulare Form bereits nur noch schwer zu detektieren, nach direkter CD28-Stimulation besteht kein Unterschied mehr zur unstimulierten Kontrolle, vermutlich ist die Nachweisgrenze unterschritten. Da sich der Ansatz weder unter reduzierenden noch nicht-reduzierenden Bedingungen in den positiven Kontrollen (TZR-Stimulation) reproduzieren ließ und auch in Gesamtzellysaten - unter Umgehung der Präzipitation - keine unterschiedlichen ζ -Formen zu detektieren waren, kann keine eindeutige Aussage zum Status der ζ -Ketten nach direkter CD28-Stimulation getroffen werden. Um dennoch eine Beteiligung des TZR an der direkten CD28-Stimulation feststellen zu können, wurde die Syk-Kinase ZAP-70 analysiert.

4.3.3 ZAP-70

ZAP-70 wird nur nach Bindung an phosphorylierte ζ -Ketten selbst phosphoryliert und aktiviert. ZAP-70-Phosphorylierung läßt somit Schlüsse auf den ζ -Phosphorylierungsstatus und damit die TZR-Beteiligung an der jeweiligen Stimulation zu.

TZR-Stimulation führte wie erwartet zu ZAP-70-Phosphorylierung, während direkte CD28-Stimulation ZAP-70 nicht aktivieren konnte (Abb. 15), obwohl zu den gewählten Zeitpunkten bereits Ick ebenso wie andere, distale Signalmoleküle, z. B. JNK (siehe Abb. 20), aktiviert waren. Dies läßt darauf schließen, daß der mitogene CD28-spezifische mAb in den von ihm aktivierten Signaltransduktionswegen zumindest frühe TZR-Ereignisse umgeht.

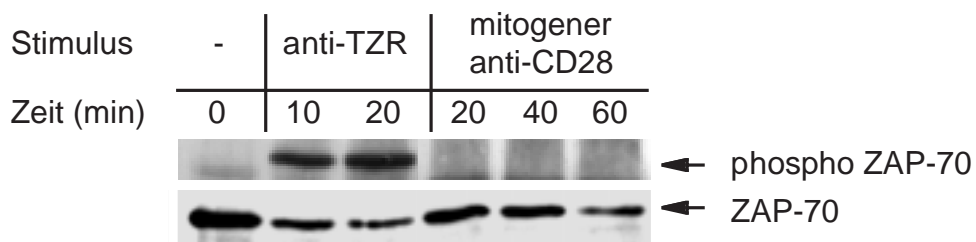


Abb. 15: Mitogene CD28-Stimulation aktiviert nicht ZAP-70

ZAP-70-Präzipitate von wie angegeben stimulierten Zellen wurden im Phosphotyrosin-Western Blot mit dem Phosphotyrosin-spezifischen mAb 4G10 und sekundärem Ziege anti-Maus Ig gekoppelt an HRPO analysiert. Nach „Stripping“ wurde der Blot mit ZAP-70-spezifischem Antiserum und Maus anti-Kaninchen Ig erneut entwickelt.

Lange Zeit war unklar, welches die Substrate von ZAP-70 sind und wie die Signalkaskade vom TZR zum Kern weitergeführt wird. Mittlerweile sind zwei Adapterproteine bekannt, die von ZAP-70 phosphoryliert werden und damit Bindungsstellen für weitere Signalmoleküle bieten: LAT und SLP-76. Um das vorhergehende Ergebnis zu bestätigen und auch auf der Ebene der Adaptermoleküle TZR-Beteiligung an der direkten CD28-Stimulation auszuschließen, wurden diese beiden Moleküle analysiert.

4.3.4 LAT und SLP-76

Zur Untersuchung dieser beiden Proteine wurde ausgenutzt, daß zur Präzipitation nicht nur Antikörper benutzt werden können, sondern auch die unter physiologischen Bedingungen vorkommenden Interaktionen zwischen Molekülen bzw. ihren Domänen und Motiven zur Isolierung ausreichend sind. Das Adapterprotein Grb-2 enthält eine SH2- und zwei SH3-Domänen, an die phosphoryliertes LAT (SH2) und SLP-76 (SH3) binden können. Ein rekombinantes GST-Grb-2 Fusionsprotein wurde eingesetzt, um in einem Schritt LAT und SLP-76 aus den Lysaten unterschiedlich stimulierter Zellen zu präzipitieren. Die Entwicklung des Western Blots mit dem anti-Phosphotyrosin-spezifischen Antikörper 4G10 zeigt, daß sowohl LAT (Abb. 16) als auch SLP-76 (Abb. 17) nach Stimulation mit TZR-Beteiligung, also TZR-Ligation und Kostimulation, phosphoryliert sind. Im Gegensatz dazu ist LAT nach direkter CD28-Stimulation fast gar nicht und SLP-76 nur sehr schwach phosphoryliert.

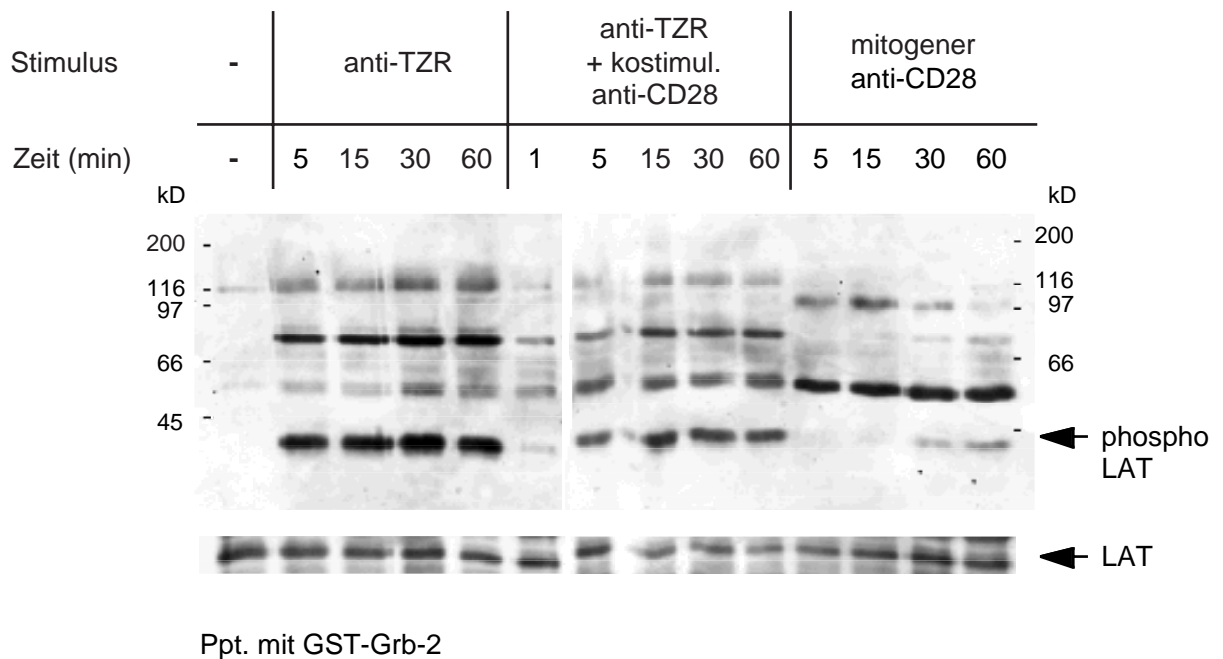


Abb. 16: Geringe LAT-Phosphorylierung nach direkter CD28-Stimulation

An Grb-2 bindende Proteine wurden mit einem GST-Grb-2 (SH2-SH3) Fusionsprotein aus den NP-40-Lysaten stimulierter T-Zellen präzipitiert und im Phosphotyrosin-Blot mit 4G10 analysiert. Nach Stripping wurde die Identität des 36kD Proteins mit einem LAT-spezifischen Antiserum nachgewiesen.

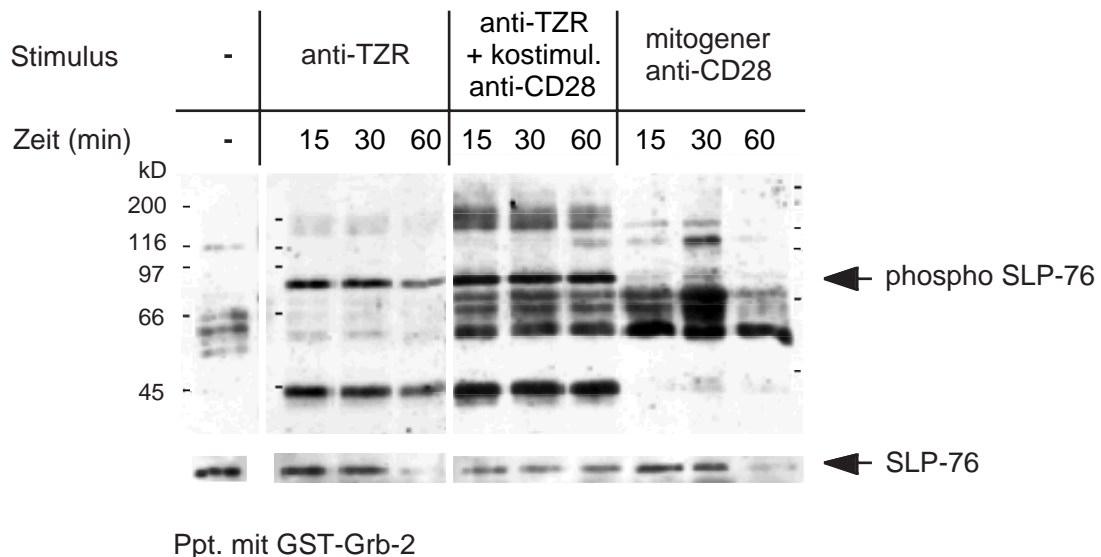


Abb. 17: Geringe SLP-76-Phosphorylierung nach direkter CD28-Stimulation

An Grb-2 bindende Proteine wurden mit einem GST-Grb-2 (SH2-SH3) Fusionsprotein aus den NP-40-Lysaten stimulierter T-Zellen präzipitiert und im Phosphotyrosin-Blot mit 4G10 analysiert. Nach Stripping wurde die Identität des 76kD Proteins mit einem SLP-76-spezifischen mAb nachgewiesen.

Obwohl die Bindung von LAT an die SH2-Domäne von Grb-2 *in vivo* phosphorylierungsabhängig ist, wird durch das Fusionsprotein vergleichbar viel unphosphoryliertes wie phosphoryliertes LAT präzipitiert. Vermutlich bestehen Unterschiede in der Konformation des Fusionsproteins gegenüber dem nativen Protein, die die Interaktion zwischen LAT und GST-Grb-2 unabhängig von Phosphorylierungen machen. Das präzipitierte 36 kD Protein wurde mit einem LAT-spezifischen Antiserum aber zweifelsfrei als LAT identifiziert.

Zusammenfassend läßt sich somit sagen, daß auch die späte und dann nur geringe LAT- und SLP-76-Phosphorylierung nach direkter CD28-Stimulation wieder für die Umgehung der frühen TZR-Ereignisse durch den mitogenen CD28 mAb sprechen.

Sowohl in Abb. 16 als auch Abb. 17 sind weitere phosphorylierte Proteine von etwa 97-100 und 116-120 kD detektiert worden, es könnte sich dabei um Vav (95 kD), ein GDP/GTP-Austauschfaktor für Rho-ähnliche GTPasen, und Cbl (120 kD), eine negativ regulierende Kinase, handeln. Allerdings gelang die Identifizierung mit spezifischen Antikörpern bislang nicht. Die 50-60 kD-Bande dürfte die schwere Kette der zur Stimulation benutzten Antikörper sein, die durch den sekundären Antikörper im Western Blot mitentwickelt wurde.

4.4 Membrandistale Signalereignisse (MAPK)

4.4.1 ERK

Die unmittelbar den Rezeptoren nachgeordneten Signalereignisse münden in die Aktivierung von MAPKinasen. Drei wichtige MAPK-Kaskaden sind in T-Zellen beschrieben (Rudd, 1996). Eine dieser, der ERK-Weg, wird hauptsächlich durch den TZR kontrolliert und aktiviert und ist damit unabhängig von Kostimulation. Dies bestätigt sich mit einem phospho ERK-spezifischen Blot von Gesamtzelllysaten (Abb. 18), der deutliche ERK-Phosphorylierung nach TZR-Stimulation zeigt, die durch zusätzliche CD28-Signale (Kostimulation) weder verstärkt noch verlängert wird. Im Gegensatz dazu löst die Stimulation mit dem mitogenen CD28 mAb nur eine schwache Phosphorylierung der MAPK ERK aus. Erneut unterstützt dieser Befund die Feststellung, daß direkte CD28-Stimulation sich nicht die TZR-Signalmaschinerie zu eigen macht.

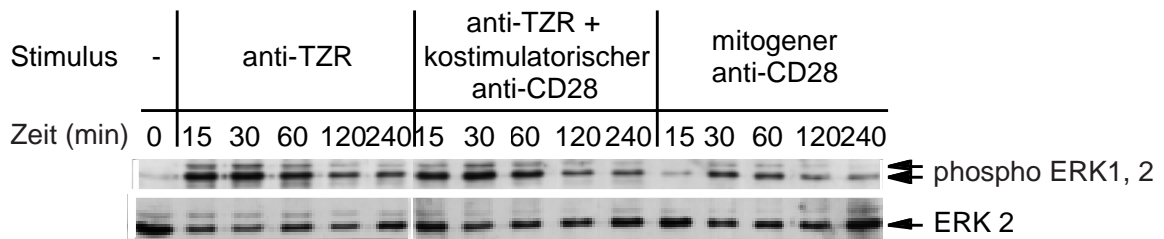


Abb. 18: Schwache ERK-Phosphorylierung nach direkter CD28-Stimulation

T-Zellen wurden wie angegeben stimuliert. ERK-Phosphorylierung wurde in Gesamtzellsaten (6×10^5 T-Zellen pro Bahn) mit einem phospho ERK-spezifischen Antiserum nachgewiesen. Durch Stripping und Entwicklung mit einem ERK2-spezifischen Serum wurde das Vorhandensein von ERK2 in allen Proben dokumentiert.

4.4.2 p38

Eine zweite MAPK ist p38, die ähnlich wie die noch zu behandelnde c-Jun Kinase (JNK) durch Stress wie UV-Licht und osmotische Schwankungen aktiviert werden kann. In T-Zellen kann p38-Stimulation auch über ein TZR-Signal erfolgen, der Beitrag oder die Unterstützung durch CD28 scheint dabei von dem System, das verwendet wurde, abzuhängen. In den hier stimulierten primären Ratten-T-Zellen führt TZR-Ligation zur Phosphorylierung von p38, wie der Nachweis mit einem phospho p38-spezifischen Antikörper im Western Blot aus Gesamtlysaten stimulierter Zellen zeigt (Abb. 19). Kostimulation kann den Effekt geringfügig verstärken. In ähnlicher Weise aktiviert mitogene CD28-Stimulation p38, die Aktivierung ist vergleichbar stark wie nach Kostimulation.

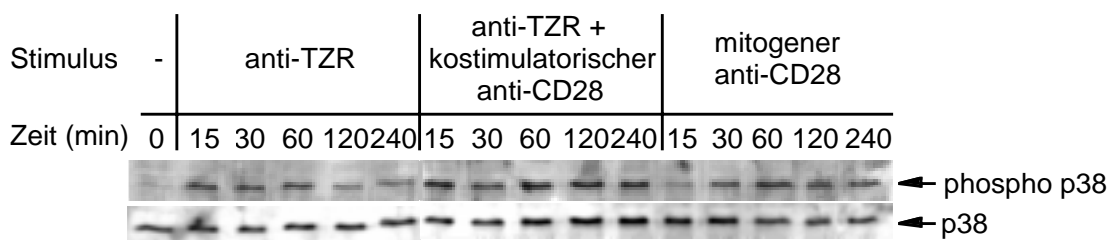


Abb. 19: Direkte CD28-Stimulation induziert p38

T-Zellen wurden wie angegeben stimuliert. p38-Phosphorylierung wurde in Gesamtzellsaten (6×10^5 T-Zellen pro Bahn) mit einem phospho p38-spezifischen Antiserum nachgewiesen. Durch Stripping und Entwicklung mit einem p38-spezifischen Serum wurde das Vorhandensein von p38 in allen Proben dokumentiert.

4.4.3 JNK

Die dritte MAPK JNK wurde als Integrator für TZR- und CD28-vermittelte Signale beschrieben, die nur durch das Zusammenspiel der von TZR und CD28 ausgehenden Signale voll aktiviert wird. Um JNK-Aktivität in Reaktion auf mitogene CD28-Stimulation zu analysieren, wurde JNK mit einem spezifischen Antikörper präzipitiert. Ein *in vitro* Kinase-Assay mit dem GST-Fusionsprotein c-Jun als exogenem Substrat zeigt (der Transkriptionsfaktor c-Jun ist eines der natürlichen Substrate von JNK), daß alleinige TZR-Kreuzvernetzung nur geringe JNK-Aktivität hervorruft (Abb. 20). Kostimulation bewirkt, wie erwartet, starke Phosphorylierung des exogenen Substrats. Mitogener CD28-spezifischer Antikörper löst ebenso starke und lang andauernde JNK-Aktivität aus.



Abb. 20: Mitogene CD28-Stimulation aktiviert den Signalintegrator JNK

*T-Zellen wurden den angegebenen Protokollen folgend stimuliert. JNK-Aktivität wurde in JNK-Präzipitaten in einem *in vitro* Kinase-Test mit GST-c-Jun als exogenem Substrat bestimmt.*

Damit konnte gezeigt werden, daß der „Signalintegrator“ JNK direkt durch CD28 ohne TZR-Ligation aktiviert werden kann; gleiches gilt für die in primären Mauszellen und Jurkat-T-Zellen (Salojin et al., 1999; Schafer et al., 1999b) ebenfalls als Signalintegrator beschriebene p38 Kinase. Die schwache ERK-Phosphorylierung nach direkter CD28-Stimulation zeigt Unterschiede in der Balance der einzelnen Kaskaden zueinander nach Kostimulation und direkter CD28-Stimulation.

4.4.4 Einfluß verschiedener Inhibitoren auf JNK-Aktivität

Da die Aktivierung der JNK-Kaskade ein zentrales Element der direkten CD28-Stimulation zu sein scheint, wurde dieser Signalweg genauer untersucht. Mit Hilfe von Inhibitoren unterschiedlicher Signalproteine und -wege sollte geklärt werden, von welchen Wegen die JNK-Aktivierung abhängt. Dazu wurden die Zellen in Anwesenheit der einzelnen Inhibitoren stimuliert - aufgrund der geringen JNK-Aktivierung nach TZR-Stimulation wurden nur Kostimulation und direkte CD28-Stimulation in den Versuch einbezogen - und die JNK-Aktivität in JNK-Präzipitaten

mit c-Jun als exogenem Substrat getestet. Die Kinase-Assays erfolgten ohne Zugabe des jeweiligen Inhibitors.

Der lck-Inhibitor Emodin hemmt die durch Kostimulation induzierte JNK-Aktivität bereits in einer Konzentration von 20 μ M (Abb. 21a), während in der direkten CD28-Stimulation erst ab 50 μ M ein negativer Einfluß zu sehen ist (Abb. 21b). Als Toxizitätskontrolle für den Inhibitor wurde eine Stimulation mit PMA/Ionomycin durchgeführt. PMA aktiviert Proteinkinase C-Isoformen, Ionomycin als Calciumionophor induziert Calciumflux. In zahlreichen Studien werden die beiden Mitogene als Ersatz für TZR-Ligation (PMA) oder CD28-Signale (Ionomycin) verwendet. Da die sie mit PKC-Aktivierung und Induktion von Calciumflux distal von lck in Zellabläufe eingreifen, sollte nach dieser Stimulation JNK-Aktivität unbeeinflußbar von Emodin ausgelöst werden. Abb. 21c zeigt, daß JNK-Aktivität bei der niedrigen Emodinkonzentration unverändert bleibt, durch 50 μ M Emodin aber gehemmt wird. Daher liegt die Vermutung nahe, daß Emodin in einer Konzentration von 50 μ M bereits toxisch auf die Zellen wirkt. Nach dieser Interpretation wäre die durch mitogenen CD28-spezifischen Antikörper vermittelte JNK-Aktivität lck-unabhängig, aber immer noch hemmbar durch den src-Kinasen-Inhibitor PP1 (Abb. 21b), der sowohl durch Kostimulation als auch durch direkte CD28-Stimulation hervorgerufene JNK-Aktivität unterdrückt. Danach wäre nicht lck, sondern die zweite src-Kinase in T-Zellen, p59 fyn, für die JNK-Aktivierung nach direkter Stimulation wichtig. Da PMA und Ionomycin zusammen aber auch lck aktivieren (Abb. 24b), könnte lck auch bei der durch PMA/Ionomycin vermittelten JNK-Aktivierung beteiligt sein, so daß die verminderte c-Jun-Phosphorylierung bei einer Emodinkonzentration von 50 μ M nicht durch toxische Emodineffekte, sondern durch spezifische Hemmung zu erklären ist. Für diesen Fall wäre die JNK-Aktivierung nach direkter Stimulation zwar ebenfalls lck-abhängig, aber in nicht so starkem Maße wie nach Kostimulation. Auch wenn die Rolle von lck oder fyn nicht genau geklärt ist, so sind doch generell src-Kinasen Voraussetzung für die JNK-Aktivierung nach direkter CD28-Stimulation .

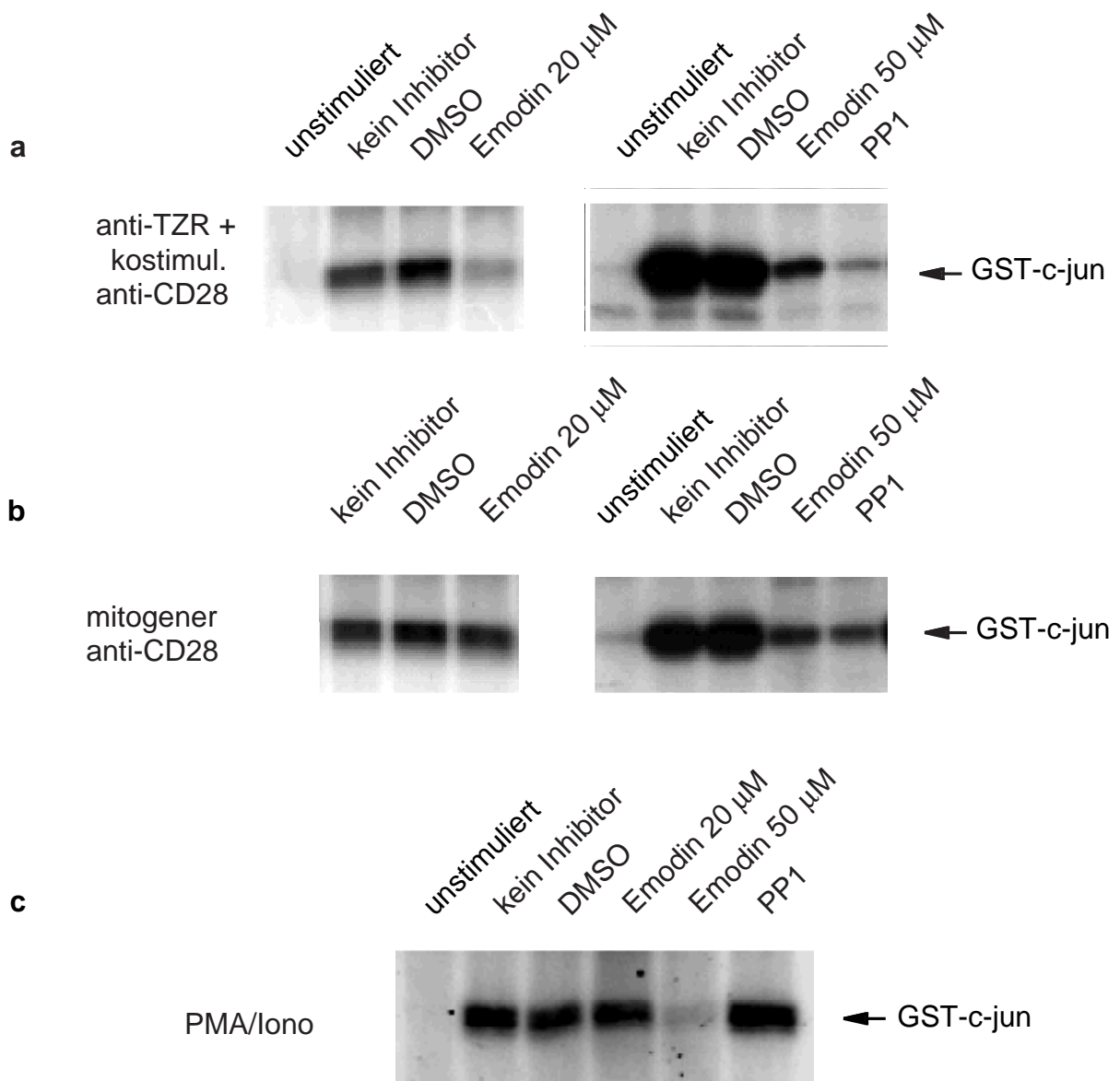


Abb. 21: Einfluß von src-Kinasen-Inhibitoren auf die JNK-Aktivität

$1-2 \times 10^7$ primäre T-Zellen wurden mit Emodin oder PP1 5 μ M bzw. 5 μ l DMSO als Lösungsmittelkontrolle bei 37°C für 30 min vorinkubiert und dann mit gleichen Inhibitorkonzentrationen für 30 min (Ko-, PMA/Iono-Stimulation) bzw. 45 min (direkte CD28-Stimulation) stimuliert. Zur PMA/Iono-Stimulation wurden 50 ng/ml PMA und 1 μ g/ml Ionomycin eingesetzt. JNK-Aktivität wurde in JNK-Präzipitaten in einem in vitro Kinase-Test mit GST-c-Jun als exogenem Substrat bestimmt.

Deutliche Unterschiede ergeben sich in der Empfindlichkeit gegenüber dem PI3-K-Inhibitor Ly294002 (Abb. 22). PI3-K spielt in der durch Kostimulation vermittelten JNK-Aktivierung eine wichtige Rolle, die Hemmung der PI3-K reduziert die c-Jun-Phosphorylierung deutlich. Im Gegensatz dazu hat die gleiche Inhibitorkonzentration auf die durch den mitogenen CD28-spezifischen mAb

induzierte JNK-Aktivität keinen Einfluß, was gleichzeitig toxische Effekte als Grund für die Inhibition der Kostimulation ausschließt.

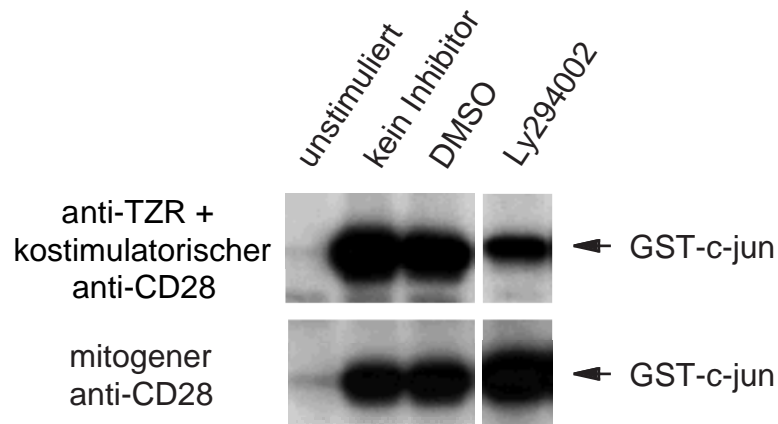


Abb. 22: PI3-K ist nur für die durch Kostimulation induzierte JNK-Aktivität wichtig

1-2x10⁷ primäre T-Zellen wurden mit 50µM des PI3-K-Inhibitors Ly294002 bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle bei 37°C für 30 min vorinkubiert und dann mit gleicher Inhibitorkonzentration für 30 min (Kostimulation) bzw. 45 min (direkte CD28-Stimulation) stimuliert. JNK-Aktivität wurde in JNK-Präzipitaten in einem in vitro Kinase-Test mit GST-c-Jun als exogenem Substrat bestimmt.

Die Proteinkinase C kann in manchen Systemen zusammen mit Calcineurin auf noch ungeklärte Weise den JNK-Weg aktivieren (Avraham et al., 1998; Werlen et al., 1998; Ghaffari-Tabrizi et al., 1999). Zusätzlich ist PKC θ die einzige PKC-Isoform, die in der Kontaktstelle von T-Zelle und APZ nachzuweisen ist (Monks et al., 1998). Aus diesem Grund wurde die Beteiligung von PKC an der JNK-Aktivierung getestet. Gö6850 kann mehrere PKC-Isoformen, u.a. auch PKC θ , inhibieren. Eine Titration des Inhibitors zeigt, daß die durch Kostimulation induzierte JNK-Aktivität empfindlicher gegenüber dem Inhibitor ist als die durch direkte CD28-Stimulation vermittelte Aktivität (Abb. 23). Damit scheint PKC in beiden Fällen an der JNK-Aktivierung beteiligt. Möglich ist, daß die auf direkte Stimulation folgende PKC-Aktivierung stärker als nach Kostimulation und damit schwerer hemmbar ist.

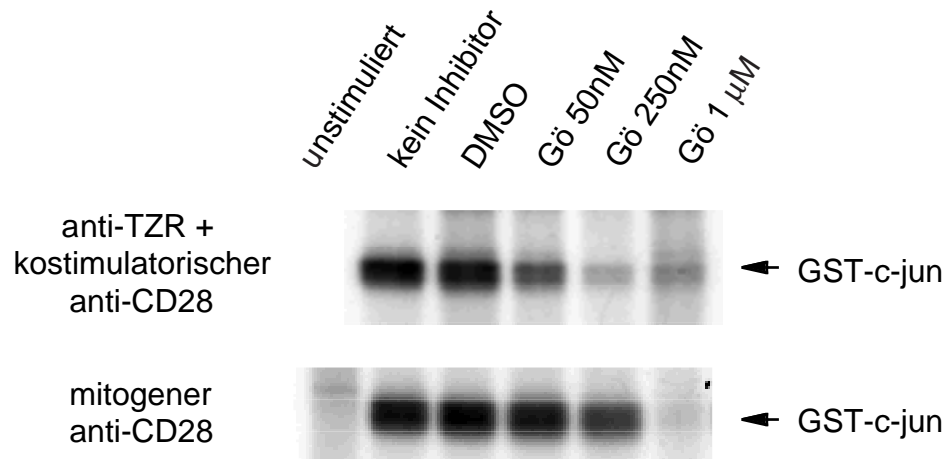


Abb. 23: Kostimulation ist empfindlicher gegenüber PKC-Inhibition als direkte CD28-Stimulation

1-2x10⁷ primäre T-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen des PKC-Inhibitors Gö6850 bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle bei 37°C für 30 min vorinkubiert und dann mit gleicher Inhibitorkonzentration für 30 min (Kostimulation) bzw. 45 min (direkte CD28-Stimulation) stimuliert. JNK-Aktivität wurde in JNK-Präzipitaten in einem in vitro Kinase-Assay mit GST-c-Jun als exogenem Substrat bestimmt.

Das Zytoskelett spielt auch für die Signaltransduktion eine wichtige Rolle (Übersicht in Penninger und Crabtree, 1999). Abb. 24a zeigt, daß die JNK-Aktivierung bei durch Cytochalasin D blockierter Aktinpolymerisierung negativ beeinflusst werden kann, unabhängig von der Art der Stimulation. Um festzustellen, ob JNK direkt von Aktinpolymerisierung abhängt oder die Blockade der Aktinpolymerisierung einen der JNK vorgeschalteten Aktivierungsschritt betrifft, wurde der Einfluß von Cytochalasin D auf die src-Kinase lck analysiert. Dabei wurde deutlich (Abb. 24b), daß zur Aktivierung von lck bereits Umlagerungen des Zytoskeletts notwendig sind. Cytochalasin D reduzierte in allen mit Rezeptorligation (TZR-, Ko-, CD28-Stimulation) verbundenen Stimulationsarten die lck-Aktivität, hatte aber keinen Einfluß auf die durch PMA und Ionomycin ausgelöste Kinaseaktivität. Daher scheint die reduzierte JNK-Aktivität in mit Cytochalasin D behandelten Zellen durch die Blockierung eines frühen Aktivierungsschrittes wie der lck-Aktivierung verursacht zu sein.

Da ohne Aktinpolymerisierung keine über den Hintergrund hinausgehende lck-Aktivität durch direkte CD28-Stimulation nachweisbar ist, läßt sich der Schluß ziehen, daß der mitogene CD28-Antikörper Aktinpolymerisierung induzieren kann. Dies wurde bestätigt durch den Nachweis von polymerisiertem F-Aktin nach

Stimulation mit mitogenem CD28-spezifischen mAb (C.-H. Lin, persönliche Mitteilung).

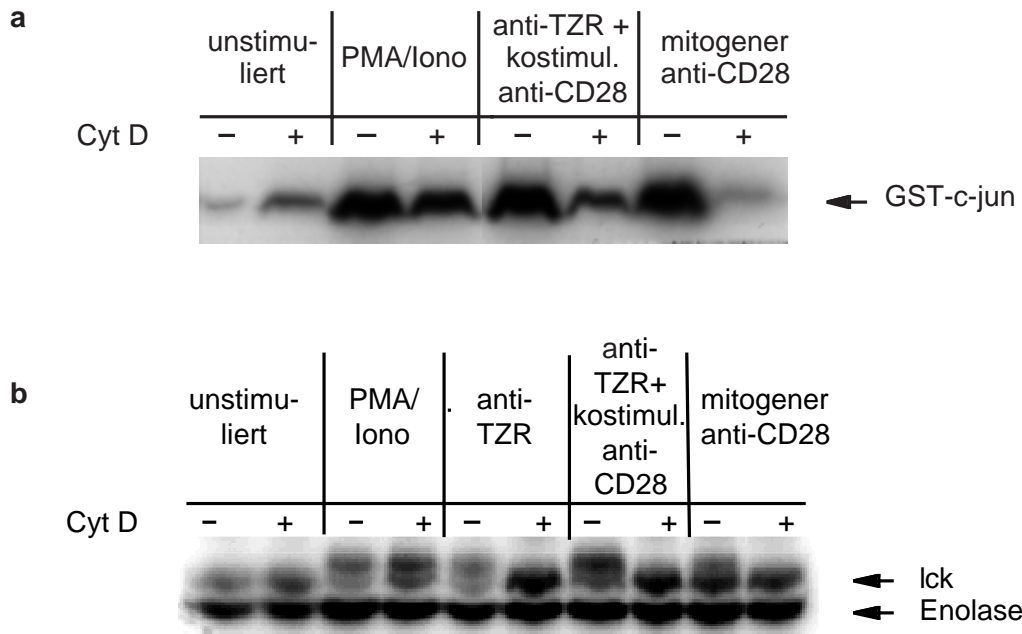


Abb. 24: Zytoskelettlagerung ist in Kostimulation und direkter CD28-Stimulation erforderlich

$1-2 \times 10^7$ primäre T-Zellen wurden mit $5 \mu\text{M}$ Cytochalasin D, das Aktinpolymerisierung verhindert, bzw. $5 \mu\text{l}$ DMSO als Lösungsmittelkontrolle bei 37°C für 30 min vorinkubiert und dann mit gleichen Inhibitorkonzentrationen für 30 min (TZR-, Ko-, PMA/Iono-Stimulation) bzw. 45 min (direkte CD28-Stimulation) stimuliert. Zur PMA/Iono-Stimulation wurden 50 ng/ml PMA und $1 \mu\text{g/ml}$ Ionomycin eingesetzt. JNK-Aktivität (a) wurde in JNK-Präzipitaten in einem in vitro Kinase-Test mit GST-c-Jun als exogenem Substrat bestimmt, Ick-Aktivität (b) wurde wie in Abb. 13 bestimmt.

SB202190 hemmt die MAPK p38, in höheren Konzentrationen ist auch eine Hemmung der JNK-Kaskade beschrieben (Jacinto et al., 1998). Da kein spezifischer JNK-Inhibitor zur Verfügung steht, ein solcher Inhibitor zur Analyse der Wichtigkeit der JNK-Kaskade aber von Vorteil wäre, sollte getestet werden, ob SB auch in Ratten T-Zellen JNK inhibieren kann. Die hier eingesetzte SB-Konzentration von $5 \mu\text{M}$ führte jedoch zu einer Erhöhung der JNK-Aktivität (Abb. 25), während eine höhere Konzentration von $40 \mu\text{M}$ bereits toxisch wirkte (nicht gezeigt). Ein Teil der erhöhten Enzymaktivität bei der Inhibitorkonzentration von $5 \mu\text{M}$ könnte als Stressreaktion angesehen werden, da bereits in der unstimulierten Kontrolle der Einsatz des Inhibitors die JNK-Aktivität steigerte. Eine weitere Erklärung könnte aber auch in einer Querverbindung zwischen JNK- und p38-Kaskade liegen, durch die p38 einen hemmenden Einfluß auf die c-Jun-Kinase besitzt. Bei dessen Wegfall zeigt JNK erhöhte Aktivität und phosphoryliert verstärkt ihr Substrat c-Jun.

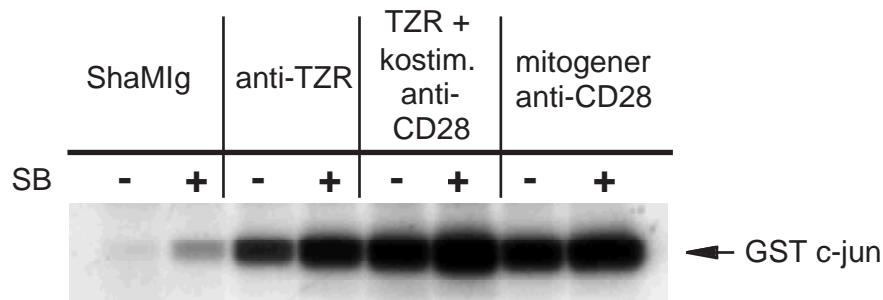


Abb. 25: p38-Inhibition steigert die JNK-Aktivität

$1-2 \times 10^7$ primäre T-Zellen wurden mit $5 \mu\text{M}$ des p38-Inhibitors SB202190 bzw. $5 \mu\text{l}$ DMSO als Lösungsmittelkontrolle bei 37°C für 30 min vorinkubiert und dann mit gleichen Inhibitorkonzentrationen für 30 min (ShaMlg, TZR-, Kostimulation) bzw. 45 min (direkte CD28-Stimulation) stimuliert. Zur PMA/Iono-Stimulation wurden 50 ng/ml PMA und $1 \mu\text{g/ml}$ Ionomycin eingesetzt. JNK-Aktivität wurde in JNK-Präzipitaten in einem in vitro Kinase-Test mit GST-c-Jun als exogenem Substrat bestimmt.

Tabelle 2 zeigt zusammenfassend den Einfluß verschiedener Inhibitoren auf die durch Kostimulation und direkte CD28-Stimulation induzierte JNK-Aktivität.

Tabelle 2: Einfluß verschiedener pharmazeutischer Inhibitoren auf die JNK-Aktivität

Inhibition von	Inhibition durch [Konz.]	Kostimulation	direkte CD28 Stimulation
Ick	Emodin $20 \mu\text{M}$	↓↓	=
	Emodin $50 \mu\text{M}$	↓↓	↓↓
src-Kinasen	PP1 $5 \mu\text{M}$	↓↓↓	↓↓
PI3-K	Ly294002 $50 \mu\text{M}$	↓↓	=
PKC	Gö6850 50 nM	↓	=
	250 nM	↓↓↓	=
	$1 \mu\text{M}$	↓↓↓	↓↓↓
Aktinpolymerisation	CytD $5 \mu\text{M}$	↓↓	↓↓↓
p38	SB202190 $5 \mu\text{M}$	↑	↑

↓↓↓ - sehr stark verminderte JNK-Aktivität

↓↓ - deutlich verminderte JNK-Aktivität

↓ - verminderte JNK-Aktivität

= - gleichbleibende JNK-Aktivität

↑ - erhöhte JNK-Aktivität

Die Unterschiede in der Sensitivität der durch Kostimulation und direkte CD28-Stimulation induzierten JNK-Aktivität gegenüber verschiedenen Inhibitoren sowie die unterschiedliche Aktivierung der ERK-Kaskade zeigen, daß mitogener CD28-spezifischer mAb andere Signaltransduktionswege benutzt als die Kombination von anti-TZR und anti-CD28 mAbs. Es scheint daher berechtigt, CD28 als eigenständiges Signalmolekül zu bezeichnen. Neben den hier beschriebenen werden sich sicherlich weitere von CD28 benutzte Signalkaskaden und -moleküle identifizieren und charakterisieren lassen.