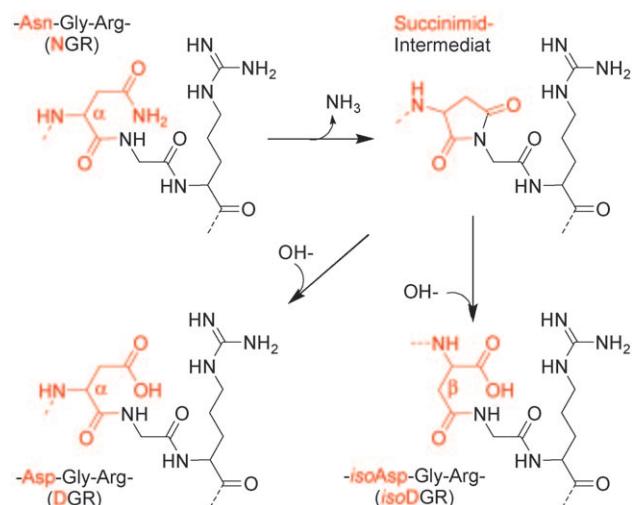


Konformative Kontrolle über Integrin-Subtyp-Selektivitäten in isoDGR-Peptidmotiven: ein biologischer Schalter**

Andreas O. Frank, Elke Otto, Carlos Mas-Moruno, Herbert B. Schiller, Luciana Marinelli, Sandro Cosconati, Alexander Bochen, Dörte Vossmeyer, Grit Zahn, Roland Stragies, Ettore Novellino und Horst Kessler*

Die Umlagerung von Asparagin zu Isoaspartat ist eine unerwünschte Nebenreaktion der Peptidsynthese,^[1] die meist zu Strukturen führt, die ihre biologische Aktivität verlieren (Schema 1).^[2] Die Isoaspartat-Bildung tritt auch in vivo auf und resultiert normalerweise in einem Verlust der Proteinfunktion. Dieser Prozess wurde daher als biologische Uhr angesehen, weil er die Lebensdauer von Proteinen beschränkt.^[4] Curnis et al. haben jedoch kürzlich gezeigt, dass die Desamidierung des Asn-Gly-Arg(NGR)-Motivs zu isoDGR im extrazellulären Matrixprotein Fibronektin (FN) zu einer erweiterten Proteinfunktion führt, indem eine neue Adhäsionsbindungsstelle für Integrine geschaffen wird.^[5,6] Hier stellen wir basierend auf dem isoDGR-Motiv hochaktive Kopf-Schwanz-cyclisierte Pentapeptide vor, die Selektivität für die nahe verwandten $\alpha\beta 3$ - und $\alpha 5\beta 1$ -Integrine aufweisen und durch räumliches Screening von Peptidbibliotheken^[7] in vitro sowie durch Zellstudien identifiziert wurden.

Integrine sind heterodimere Transmembran-Adhäsionsrezeptoren, die in fundamentale Prozesse wie Migration, Proliferation, Differenzierung und Zellbestand involviert sind.^[8] Die Peptidsequenz Arg-Gly-Asp (RGD) ist das wichtigste Motiv bei der Integrin-vermittelten Zelladhäsion



Schema 1. Die Desamidierung von NGR verläuft durch Hydrolyse eines Succinimid-Intermediats, was in Abhängigkeit von benachbarten Aminosäuren, Temperatur und Ionenstärke zur Bildung von isoDGR oder DGR führt.^[3]

an extrazelluläre Matrixproteine, z.B. FN, Vitronekton und Fibrinogen.^[9] Das RGD-Tripeptid in FN wird hierbei von mindestens vier verschiedenen Integrinen ($\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha 8\beta 1$ und $\alpha IIb\beta 3$) erkannt, was zur Bildung einer zellumgebenden FN-Matrix führt.^[10] Eine Mutation der RGD-Sequenz im „10th type III repeat FN“-Modul (Abbildung SI_1 in den Hintergrundinformationen) zu RGE in Mäusen verhindert die Integrinbindung an das mutierte Motiv.^[6] Interessanterweise kann FN, welches die RGE-Mutation trägt, trotz dieses Bindungsdefekts mithilfe des Integrins $\alpha v\beta 3$ weiterhin FN-Fibrillen bilden.^[6] Aus diesem Grund wurde spekuliert, dass das isoDGR-Motiv, welches in einer der NGR-Sequenzen im „5th type I repeat FN“-Modul (Abbildung SI_1) gebildet wird, als neue Integrinbindungsstelle fungiert.^[6] Diese Vermutung wurde jedoch kürzlich in einer Studie infrage gestellt, bei der rekombinantes FN mit Mutationen im NGR-Motiv verwendet wurde.^[11] Obwohl beide FN-Schlüsselrezeptoren $\alpha v\beta 3$ und $\alpha 5\beta 1$ das gleiche Ligandenerkennungsmotiv tragen, ist ihre Funktion nicht identisch. Nach Bindung an FN vermitteln sie unterschiedliche Zellsignale und führen zu verschiedenen Verhaltensweisen von Zellen, was wichtige Auswirkungen auf viele physiologische und pathophysiologische Prozesse wie Wundheilung, Angiogenese und Krebsmetastasierung hat.^[12]

[*] Dr. A. O. Frank,^[4] Dipl.-Chem. E. Otto,^[4] Dr. C. Mas-Moruno, Dipl.-Chem. A. Bochen, Prof. Dr. H. Kessler
Institute for Advanced Study, Technische Universität München, Department Chemie
Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching (Deutschland)
Fax: (+49) 892-891-3210
E-Mail: Kessler@ch.tum.de

Prof. Dr. L. Marinelli, Dr. S. Cosconati, Prof. Dr. E. Novellino
Dipartimento di Chimica Farmaceutica e Tossicologica
Università di Napoli „Federico II“
Via D. Montesano, 49-80131 Napoli (Italien)
Dr. H. B. Schiller
Abteilung Molekulare Medizin
Max-Planck-Institut für Biochemie
Am Klopferspitz 18, 82152 Martinsried (Deutschland)
Dr. D. Vossmeyer, Dr. G. Zahn, Dr. R. Stragies
Jerini AG
Invalidenstraße 130, 10115 Berlin (Deutschland)

[†] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit beigetragen.

[**] C.M.M. dankt der Generalitat de Catalunya für ein Postdoktoranden-Stipendium. Wir danken B. Cordes für technische Hilfe.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201004363> zu finden.

Um die Hypothese, dass die Desamidierung von NGR zu *isoDGR* zur Bildung eines neuen Bindungsepitops für das Integrin $\alpha\beta 3$ führt, zu überprüfen, haben wir versteifte *isoDGR*-Peptide hinsichtlich ihrer Integrin-Subtyp-Affinitäten untersucht. Des weiteren haben wir, inspiriert durch unsere vorherige Erkenntnis, dass die Konformation der RGD-Sequenz die Selektivität zwischen $\alpha\beta 3$ und dem Thrombozyten-Integrin $\alpha IIb\beta 3$ steuert,^[13] diese Peptide bezüglich ihrer Bindungsselektivität gegenüber den nahe verwandten Integrinen $\alpha\beta 3$ und $\alpha 5\beta 1$ untersucht. Hierfür erstellten wir verschiedene Bibliotheken Kopf-Schwanz-cyclisierte Pentapeptide, welche das *isoDGR*-Aminosäuremotiv enthalten. Neue, biologisch aktive Peptide mit dieser Sequenz könnten als Modellverbindungen für die vielfachen, NGR-tragenden Module von FN und anderen Matrixkomponenten dienen und möglicherweise dazu beitragen, die Struktur-Wirkungs- und Struktur-Selektivitäts-Beziehung der *isoDGR*-Sequenz aufzuklären.

In unserem ersten Ansatz synthetisierten wir eine kleine Bibliothek an Peptiden, basierend auf der Retrosequenz des hochaktiven, Integrin bindenden cyclischen Peptids *c*-(RGDFV),^[14] z.B. *c*-(VfisoDGR-), mithilfe eines D-Aminosäure-Scans. Diese Peptide zeigten jedoch durchweg nur mäßige bis schwache Affinitäten für $\alpha\beta 3$ und keine Aktivität gegenüber $\alpha 5\beta 1$ (Verbindungen **I** bis **V** in den Hintergrundinformationen). Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit denen einer Retrosequenz-Studie von Wermuth et al.^[15] Daraufhin erstellten wir eine zweite kleine Bibliothek mit Sequenzen, welche die GNNGRG-Schleifen in FN (Module I-5 und I-7; Abbildung SI_I) nachahmen.^[16] Die *isoDGR*-Sequenz wurde durch zwei Glycine flankiert, und ein D-Aminosäure-Scan wurde durchgeführt. Die In-vitro-Untersuchungen zeigten jedoch keine oder nur schwache Bindung der Peptide an die $\alpha\beta 3$ - und $\alpha 5\beta 1$ -Integrine (siehe Peptid **1** in Tabelle 1 und Peptide **14** und **21** in den Hintergrundinformationen).

Tabelle 1: Inhibition der Bindung löslicher $\alpha\beta 3$ - und $\alpha 5\beta 1$ -Integrin-Kopfgruppen an FN bzw. Vitronectin durch Kopf-Schwanz-cyclisierte *isoDGR*-Pentapeptide.^[a]

Cyclisches Peptid	IC ₅₀ $\alpha 5\beta 1$ [nM]	IC ₅₀ $\alpha\beta 3$ [nM]
1 <i>c</i> (GisoDGRG)	>2000	256 (± 24)
2 <i>c</i> (FisoDGRG)	>2000	633 (± 524)
3 <i>c</i> (FisoDGRG)	838 (± 160)	377 (± 272)
4 <i>c</i> (GisoDGRF)	816 (± 345)	168 (± 63)
5 <i>c</i> (GisoDGRf)	>2000	521 (± 39)
6 <i>c</i> (HpheisoDGRG)	>2000	>1000
7 <i>c</i> (hpheisoDGRG)	83 (± 21)	410 (± 107)
8 <i>c</i> (GisoDGRHphe)	>1000	203 (± 49)
9 <i>c</i> (GisoDGRhphe)	558 (± 105)	102 (± 45)
10 <i>c</i> (PhgisoDGRG)	57 (± 8)	753 (± 150)
11 <i>c</i> (phgisoDGRG)	19 (± 4)	>1000
12 <i>c</i> (CisoDGRPhg)	>2000	467 (± 162)
13 <i>c</i> (CisoDGRphg)	406 (± 191)	89 (± 19)
Cilengitid	15 (± 3)	0.54 (± 0.15)

[a] Inhibitionskonstanten wurden mit einem kompetitiven Festphasenbindungs-Assay (ELISA) ermittelt (siehe die Hintergrundinformationen für Details). Hphe: L-Homophenylalanin, hphe: D-Homophenylalanin, Phg: L-Phenylglycin, phg: D-Phenylglycin. Das hochaktiv an $\alpha\beta 3$ bindende, cyclische Pentapeptid Cilengitid, *c*-(RGDF^{Me}V),^[17] wurde als Kontrollverbindung verwendet.

Zum Erfolg führte uns schließlich eine dritte Bibliothek, welche die beiden oben erklärten Vorgehensweisen kombiniert: die cyclischen *isoDGR*-Peptide wurden durch eine aromatische Aminosäure und ein Glycin flankiert. Durch das Peptid *c*-(RGDFV-) ist es bekannt, dass die aromatische Gruppe von Phenylalanin essenziell für die Bindung an das $\alpha\beta 3$ -Integrin ist, wohingegen Valin durch andere Aminosäuren (z.B. Lysin) ohne Beeinträchtigung der Rezeptoraffinität ersetzt werden kann.^[18] Folglich synthetisierten wir cyclische *isoDGR*-Peptide, die L- und D-Phe als aromatischen Rest enthielten (Tabelle 1, Peptide **2–5**). Da die Strukturen dieser Peptide von der für *c*-(RGDFV-) beobachteten abweichen können, was z.B. zu unterschiedlichen Abständen zwischen der Integrinbindungsstasche und der aromatischen Gruppe führen kann, beschlossen wir, ebenso die räumliche Positionierung des pharmakophoren Phenylrests zu variieren, indem wir zusätzlich Homophenylalanin (Hphe; Tabelle 1, Peptide **6–9**) und Phenylglycin (Phg; Tabelle 1, Peptide **10–13**) verwendeten.

Interessanterweise bestimmt die relative Position der *isoDGR* flankierenden Reste (aromatische Aminosäure und Glycin) die Affinität der Pentapeptide für die Integrine $\alpha\beta 3$ und $\alpha 5\beta 1$. Dieser Effekt wurde hauptsächlich dann beobachtet, wenn der aromatische Rest in Form von D-Phenylglycin eingeführt wurde, was die Bedeutung der Wechselwirkung zwischen der aromatischen Gruppe und der Integrinbindungsstasche bestätigt. Hervorgehoben werden soll an dieser Stelle vor allem, dass das Peptid **11** eine vergleichbare Aktivität für $\alpha 5\beta 1$ aufweist wie der Antikrebswirkstoff Cilengitid, jedoch inaktiv gegenüber $\alpha\beta 3$ ist (siehe Tabelle 1). Unserem Wissen nach ist dies das erste cyclische Peptid basierend auf einer retro-RGD-Sequenz, das eine nanomolare Aktivität und Selektivität für $\alpha 5\beta 1$ zeigt. Es gibt lediglich das natürliche Peptid *c*(CRRETAWAC)^[19] und cyclische RGD-Peptide mit β -Aminosäuren,^[20,21] für die in Zellstudien ähnlich gute Aktivitäten und Selektivitäten gezeigt wurden. Dieses biologische Profil kann zur Aufklärung der molekularen Wirkungsweise von Cilengitid beitragen. In der Tat ist es noch nicht vollständig verstanden, ob die Antitumoralaktivität von Cilengitid seiner $\alpha\beta 3$ - oder $\alpha 5\beta 1$ -Inhibierung zugeschrieben werden kann. Darüber hinaus belegen unsere Ergebnisse, dass Kopf-Schwanz-cyclisierte Pentapeptide, welche die *isoDGR*-Sequenz enthalten, nützliche Template für das Adressieren verschiedener Integrin-Subtyp-Rezeptoren darstellen.

Um das Selektivitätsprofil der interessantesten Peptide zu verstehen, wurden die dreidimensionalen Strukturen von **11** und **13** mit Flüssigphasen-NMR-Spektroskopie und Moleküldynamik(MD)-Rechnungen^[22,23] bestimmt (Abbildung 1) und sowohl an den $\alpha\beta 3$ - (Röntgen-Kristallstruktur des Cilengitid- $\alpha\beta 3$ -Komplexes^[24]) als auch an den $\alpha 5\beta 1$ -Rezeptor (Homologiemodell^[25]) gedockt. (Eine detaillierte Beschreibung der Strukturrechnungen findet sich in den Hintergrundinformationen.)

Gemäß den Docking-Resultaten bindet das Peptid **11** an den $\alpha 5\beta 1$ -Rezeptor durch Koordination der *isoAsp*-Carboxylatgruppe an das Metallion der MIDAS (Metallion-abhängige Adhäsionsstelle) sowie durch Bildung einer zweizähnigen Salzbrücke zwischen der Arg-Guanidiniumgruppe

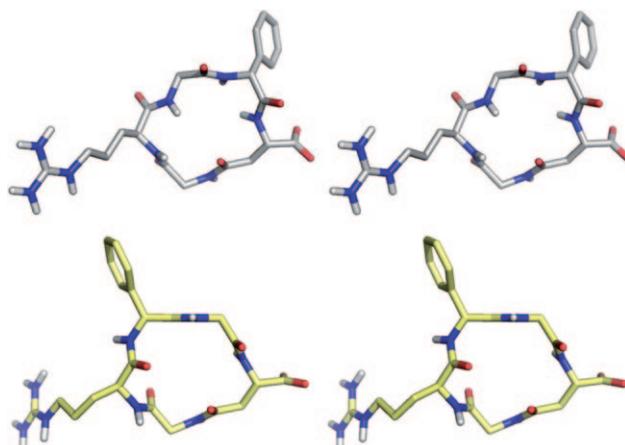


Abbildung 1. Stereostruktur der cyclischen Pentapeptide **11** (oben) und **13** (unten), welche das *isoDGR*-Motiv enthalten und an verschiedene Integrinrezeptor-Subtypen binden. Das Peptid **11** zeigt eine nanomolare Affinität gegenüber $\alpha 5\beta 1$, wohingegen das Peptid **13** an das $\alpha\beta 3$ -Integrin bindet.

und ($\alpha 5$)-Asp227 und einer H-Brücke mit der Rückgrat-Carbonylgruppe von ($\alpha 5$)-Ala222 (Abbildung 2). Eine weitere H-Brücke wurde zwischen der Gly-NH-Gruppe des Peptids und der ($\beta 1$)-Ser221-Seitenkette detektiert. Interes-

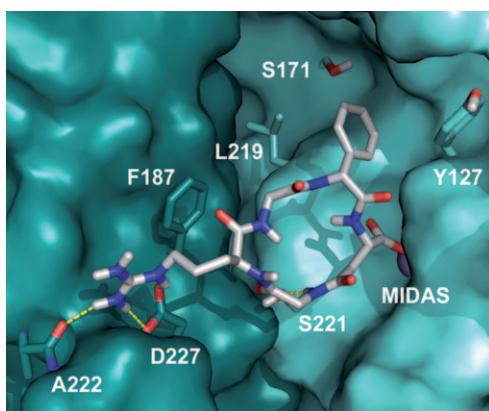


Abbildung 2. Gedockte Struktur von **11** (weiß) in der $\alpha 5\beta 1$ -Integrin-Bindungstasche. Die $\alpha 5$ - und $\beta 1$ -Untereinheiten sind durch eine dunklere bzw. hellere türkise Oberfläche gekennzeichnet. In beiden Untereinheiten sind die Aminosäure-Seitenketten, die relevant für die Ligan- denbindung sind, als Stabmodelle hervorgehoben. Das Metallion der MIDAS-Region ist als lila farbene Kugel dargestellt. Der Einbuchstabencode wurde für folgende Aminosäuren verwendet: A = Ala, D = Asp, F = Phe, G = Gly, L = Leu, S = Ser, Y = Tyr.

santerweise liegt D-Phg in der Nähe von ($\beta 1$)-Tyr127 (Abstand der Ringmittelpunkte: 5.6 Å), was eine π - π -Wechselwirkung wahrscheinlich macht. Es fällt auf, dass das D-Phg in Richtung der weiten Tasche unterhalb der spezifitätsbestimmenden Schleife (SDL) weist, die aus den Aminosäuren ($\beta 1$)-Leu219, ($\beta 1$)-Ser171 und ($\beta 1$)-Gly217 besteht. Dieser vorhergesagte Bindungsmodus könnte die beobachtete hohe Aktivität von **11** gegenüber dem $\alpha 5\beta 1$ -Rezeptor erklären. Wie vorhersehbar ist, kann der beschriebene, begünstigte

Bindungsmodus von **11** am $\alpha\beta 3$ -Rezeptor nicht gefunden werden (siehe die Hintergrundinformationen für Details).

Zusätzlich zu der Wechselwirkung mit dem Metallion und mit (α)-Asp218 (Abbildung 3) wird D-Phg in der energetisch

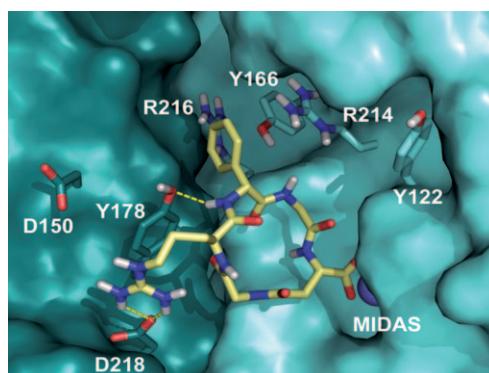


Abbildung 3. Gedockte Struktur von **13** (gelb) in der $\alpha\beta 3$ -Integrin-Bindungstasche. Die $\alpha 5$ - und $\beta 1$ -Untereinheiten sind durch eine dunklere bzw. hellere türkise Oberfläche gekennzeichnet.

günstigsten Konformation des an $\alpha\beta 3$ gebundenen Peptids **13** zwischen die aromatischen Seitenketten von (α)-Tyr178 und ($\beta 3$)-Tyr166 platziert. Im Besonderen weisen die Hydroxygruppen beider Tyr-Reste in Richtung der Seite des D-Phg-Rings, wodurch eine günstige Wechselwirkung eintritt und eine H-Brücke zwischen der D-Phg-NH- und der (α)-Tyr178-OH-Gruppe gebildet wird.

In einer alternativen Bindungskonformation, die nur wenig energiereicher ist, wird D-Phg in dieselbe Tasche gedockt, bildet jedoch eine Kation- π -Wechselwirkung mit der ($\beta 3$)-Arg214-Seitenkette (Abbildung SI_2). Bemerkenswerterweise scheinen die günstigen Wechselwirkungen mit (α)-Tyr178, ($\beta 3$)-Tyr166 und ($\beta 3$)-Arg214, allesamt charakteristisch für $\alpha\beta 3$, die Ursache für den Rückgang der $\alpha 5\beta 1$ -Affinität zu sein. Ein Vergleich der Bindungsmodi von **11**, **13** und Cilengitid in $\alpha\beta 3$ findet sich in den Hintergrundinformationen.

Integrinselektive Verbindungen können verwendet werden, um Zellen mit spezifischen Integrinprofilen zu attackieren, wie es beispielsweise der Erfolg des $\alpha\beta 3$ - und $\alpha 5\beta 1$ -selektiven cyclischen Peptids Cilengitid in klinischen Studien an Glioblastomen zeigt.^[26] Um die Bindungskapazität und -spezifität von **11** und **13** auch in lebenden Zellen zu testen, vorinkubierten wir Mausfibroblasten, die ausschließlich entweder $\alpha\beta 3$ oder $\alpha 5\beta 1$ exprimierten, mit steigenden Konzentrationen an **11** und **13**, bevor sie an FN gehaftet wurden (siehe die Hintergrundinformationen für Details). Die Abnahme der Zellbindung an FN, vermittelt durch $\alpha\beta 3$ oder $\alpha 5\beta 1$, ist mit den Bindungskonstanten der cyclischen Peptide gegenüber den entsprechenden Integrinen verknüpft. Anzumerken ist, dass aufgrund der verschiedenen Expressionsniveaus der Integrine auf den verschiedenen Zell-Linien (linke und rechte Spalte) nur relative Bindungsaktivitäten verglichen werden können (Tabelle 2). Die Resultate korrelieren jedoch gut mit den kompetitiven Festphasenbindungs-Assays (siehe Tabelle 1). Für **11** ist der IC_{50} -Wert zum Blo-

Tabelle 2: Bindungsaktivitäten von Kopf-Schwanz-cyclisierten *isoDGR*-Pentapeptiden gegenüber Mausfibroblasten, die selektiv entweder $\alpha 5\beta 1$ - oder $\alpha v\beta 3$ -Integrin-Heterodimere exprimieren.^[9]

Cyclisches Peptid	$IC_{50} \alpha 5\beta 1$ [μM]	$IC_{50} \alpha v\beta 3$ [μM]
11 c(phg/isoDGRG)	4.2	1.0
13 c(CisoDGRphg)	87	0.35
Cilengitid	2.0	0.009

[a] Die Konzentrationen von Kopf-Schwanz-cyclisierten *isoDGR*-Pentapeptiden zur Inhibition der Zelladhäsion an FN wurden mit einem zellulären Adhäsionsblockade-Assay getestet (siehe die Hintergrundinformationen für Details). Die gezeigten IC_{50} -Werte für die verschiedenen Rezeptoren (mittlere und rechte Spalte) können nicht miteinander verglichen werden, da die Integrinexpression der jeweiligen Zelllinien unterschiedlich ist.

ckieren des Integrins $\alpha 5\beta 1$ etwa 20-mal niedriger als der für **13** und damit ähnlich zu dem der Referenz Cilengitid. Demgegenüber war die IC_{50} , um $\alpha v\beta 3$ zu blockieren, für **13** etwa dreifach niedriger als für **11**. Wir konnten somit zeigen, dass die Verbindungen **11** und **13** selektiv an $\alpha 5\beta 1$ bzw. $\alpha v\beta 3$ in Zellen binden, was mit den Werten der durch Verwendung gereinigter, löslicher Rezeptoren gewonnenen Bindungskonstanten übereinstimmt.

Peptide, welche das NGR- oder *isoDGR*-Motiv enthalten, werden ähnlich wie RGD-Peptide^[14b, 17, 27] eingesetzt, um die Neubildung von Tumorgefäßsystemen zu blockieren oder zum molekularen „Targeting“ und zur molekularen Bildgebung zu nutzen,^[28] was zukünftig zu einem wichtigen Mittel für den Wirkstofftransport und die Tumorthерапie werden kann. Es wurde beobachtet, dass eine freie α -Aminogruppe in Nachbarschaft zu *isoDGR* die Integrinaffinität verringert, wohingegen deren Acetylierung die Affinität zwar erhöht, jedoch einen Verlust der Spezifität zur Folge hat.^[29] In unserer Studie haben wir Kopf-Schwanz-cyclisierte *isoDGR*-Pentapeptide ohne freie α -Aminogruppen verwendet, was einen direkten Vergleich der Konfiguration und der chemischen Eigenschaften der flankierenden Reste zuließ. Die relative Starrheit der kleinen cyclischen Peptide beweist die Wichtigkeit des aromatischen Rests in den benachbarten Aminosäuren hinsichtlich der Selektivität dieser Substanzen gegenüber den Integrinen $\alpha 5\beta 1$ und $\alpha v\beta 3$. Des weiteren wurden die Orientierungen der bindungsrelevanten Reste untersucht und Hinweise auf eine stereochemische Kontrolle der Aktivität gefunden. Somit sind unsere Ergebnisse für das rationale Design von *isoDGR*-Wirkstoff-Konjugaten und Fusionsproteinen von Interesse. Darüber hinaus spielen diese Resultate eine essenzielle Rolle für die Entwicklung von Proteinen, die durch eine NGR-*isoDGR*-Umlagerung einen kontrollierten Wechsel von Bindungsaffinitäten gegenüber verschiedenen Integrin-Subtypen in In-vivo-Studien ermöglichen.

Eingegangen am 16. Juli 2010

Online veröffentlicht am 18. Oktober 2010

Stichwörter: Integrinliganden · *isoDGR*-Sequenz · NMR-Spektroskopie · Peptide · Cyclische Pentapeptide

- [1] M. Bodanzsky, *Principles of Peptide Synthesis*, Springer Laboratory, Berlin, **1993**, S. 202.
- [2] T. Furuchi, K. Saurako, M. Katane, M. Sekine, H. Homma, *Chem. Biodiversity* **2010**, *7*, 1337–1348.
- [3] R. Tyler-Cross, V. Schirch, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 22549–22556.
- [4] T. Geiger, S. Clark, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 785–794.
- [5] F. Curnis, R. Longhi, L. Crippa, A. Cattaneo, E. Donossola, A. Bachi, A. Corti, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 36466–36476.
- [6] S. Takahashi et al., *J. Cell Biol.* **2007**, *178*, 167–178.
- [7] H. Kessler, R. Gratias, G. Hessler, M. Gurrath, G. Müller, *Pure Appl. Chem.* **1996**, *68*, 1201–1205.
- [8] R. O. Hynes, *Nat. Med.* **2002**, *8*, 918–921.
- [9] E. D. Plow, T. A. Haas, L. Zhang, J. Loftus, J. Smith, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 21785–21788.
- [10] M. Leiss, K. Beckmann, A. Giros, M. Costell, R. Fässler, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2008**, *20*, 502–507.
- [11] J. Xu, L. M. Maurer, B. R. Hoffmann, D. S. Annis, D. F. Mosher, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 8563–8571.
- [12] M. R. Morgan, A. Byron, M. J. Humphries, M. D. Bass, *IUBMB Life* **2009**, *61*, 731–738.
- [13] T. Weide, A. Modlinger, H. Kessler, *Top. Curr. Chem.* **2007**, *272*, 1–50.
- [14] a) M. Aumailley, M. Gurrath, G. Müller, J. Calvete, R. Timpl, H. Kessler, *FEBS Lett.* **1991**, *291*, 50–54; b) A. Meyer, J. Auernheimer, A. Modlinger, H. Kessler, *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12*, 2723–2747.
- [15] J. Wermuth, S. L. Goodman, A. Jonczyk, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1328–1335.
- [16] P. D. Matteo, F. Curnis, R. Longhi, G. Colombo, A. Sacchi, L. Crippa, M. P. Protti, M. Ponzoni, S. Toma, A. Corti, *Mol. Immunol.* **2006**, *43*, 1509–1518.
- [17] M. A. Dechantsreiter, E. Planker, B. Mathä, E. Lohof, G. Hölzemann, A. Jonczyk, S. L. Goodman, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3033–3040.
- [18] R. Haubner, R. Gratias, B. Diefenbach, S. L. Goodman, A. Jonczyk, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7461–7472.
- [19] E. Koivunen, B. C. Wang, E. Ruoslahti, *J. Cell Biol.* **1994**, *124*, 373–380.
- [20] D. Zimmermann, E. W. Guthöhrlein, M. Maesevic, K. Sewald, L. Wobbe, C. Heggemann, N. Sewald, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 272–276.
- [21] S. Urman, K. Gaus, Y. Yang, U. Strijowski, N. Sewald, S. De Pol, O. Reiser, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 4050–4053; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3976–3978.
- [22] E. Lindahl, B. Hess, D. J. van der Spoel, *Mol. Model.* **2001**, *7*, 306–317.
- [23] C. Oostenbrink, T. A. Soares, N. F. A. van der Vegt, W. F. van Gunsteren, *Eur. Biophys. J.* **2005**, *34*, 273–284.
- [24] J.-P. Xiong, T. Stehle, R. Zhang, A. Joachimiak, M. Frech, S. L. Goodman, M. A. Arnoult, *Science* **2002**, *296*, 151–155.
- [25] D. Heckmann, A. Meyer, L. Marinelli, G. Zahn, R. Stragies, H. Kessler, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 3641–3644; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3571–3574.
- [26] R. Stupp et al., *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 2712–2718.
- [27] M. Schottelius, B. Laufer, H. Kessler, H.-J. Wester, *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 969–980.
- [28] A. Corti, F. Curnis, W. Arap, R. Pasqualini, *Blood* **2008**, *112*, 2628–2635.
- [29] F. Curnis et al., *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 9114–9123.