

# Identifizierung und Strukturbestimmung eines niedermolekularen Aktivators der LFA-1/ICAM-1-Bindung\*\*

Martin Hintersteiner,\* Jörg Kallen, Mario Schmied, Christine Graf, Thomas Jung, Gemma Mudd, Steven Shave, Hubert Gstach und Manfred Auer\*

**Abstract:** Die Stabilisierung von Protein-Protein-Interaktionen durch kleine Moleküle ist ein vergleichsweise neuer Ansatz, für den bis dato nur wenige Beispiele erbracht wurden. Hier beschreiben wir die Identifizierung von IBE-667, einem kleinen Molekül, dass die Affinität von LFA-1 für ICAM-1 erhöht, sowie die mittels Röntgencokristallisation erhaltene Struktur des IBE-667/LFA-1-Komplexes. Das Design von IBE-667 basierte auf der Struktur-Aktivitäts-Beziehung, welche aus einem vorherigen On-Bead-Screen von markierten kombinatorischen One-Bead-One-Compound(OBOC)-Substanzbibliotheken durch konfokales Nanoscanning und Bead Picking (CONA) abgeleitet wurde. Mithilfe von zellulären Analysen an aktivierten Immunzellen konnte gezeigt werden, dass IBE-667 die Bindung von LFA-1 an ICAM-1 verstärkt.

Das Integrin LFA-1 (leukozytenfunktionsassoziiertes Antigen 1) ist ein heterodimerer Immunrezeptor, der ubiquitär auf Leukozyten exprimiert wird. Die Bindung von LFA-1 mit dem interzellulären Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1) ist entscheidend für das Immunsystem, um eine frühe zellvermittelte Immunantwort auszulösen.<sup>[1–3]</sup> Auf diese Weise erken-

nen T-Zellen antigenpräsentierende Zellen. Die Bindungsachse zwischen LFA-1 und ICAM-1 wurde aus diesem Grund bereits früher als möglicher Ansatzpunkt für die Medikamentenentwicklung beschrieben.<sup>[4–7]</sup> Allerdings stellt die Konformationsänderung von niedrig affinen zu hochaffinen Zuständen, die mit der Bindung von LFA-1 an ICAM-1 einhergeht, eine erhebliche Hürde für die Konstruktion von LFA-1-Inhibitoren dar.<sup>[8,9]</sup>

Obwohl die Inhibierung von Protein-Protein-Interaktionen (PPIs) mittels kleiner Moleküle lange Zeit als die ultimative Herausforderung in der Wirkstoffentwicklung galt, wurden nur sehr wenige Beispiele für solche PPI-Inhibitoren beschrieben.<sup>[10–13]</sup> Demgegenüber gibt es klare mechanistischer-konzeptionelle Argumente dafür, dass PPI-Stabilisatoren großes Potential haben könnten.<sup>[14]</sup> LFA-1-Aktivatoren wären ein vielversprechender Ansatz für die Behandlung einer seltenen Erbkrankheit, bekannt als Leukozytenadhäsionsdefizienz (LAD), oder als mögliche Verstärker in der Tumorimmuntherapie.<sup>[15,16]</sup>

Ein scheinbarer Aktivator für LFA-1 wurde bisher beschrieben,<sup>[17]</sup> allerdings ergab die nähere Untersuchung, dass diese Substanz im Endeffekt als Inhibitor wirkt, da sie die transendotheliale Migration von Leukozyten blockiert.

[\*] G. Mudd, Dr. S. Shave, Prof. M. Auer  
The University of Edinburgh, School of Biological Sciences (CSE)  
and School of Biomedical Sciences (CMVM), CH Waddington  
Building, 3.07, The King's Buildings  
Mayfield Road, Edinburgh, EH9 3JD (Großbritannien)  
E-Mail: manfred.auer@ed.ac.uk

Dr. M. Hintersteiner  
Bioseutica BV  
Corso Elvezia 4, 6900 Lugano (Schweiz)  
E-Mail: MHintersteiner@bioseutica.com

Dr. H. Gstach  
Institute of Medical Chemistry, Medical Univ. of Vienna  
Waehringerstraße 10, 1090 Vienna (Österreich)

M. Schmied, C. Graf, Dr. T. Jung  
Novartis Institutes for BioMedical Research  
Brunnerstraße 59, 1235 Vienna (Österreich)

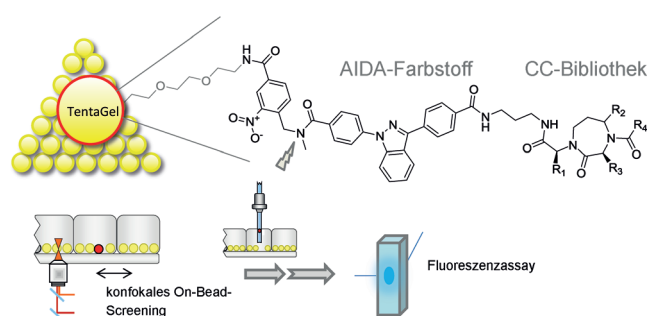
Dr. J. Kallen  
Novartis Institutes for BioMedical Research  
Novartis Campus, 4056 Basel (Schweiz)

[\*\*] Die Autoren danken Dipl.-Ing. Beate Hintersteiner für die Hilfe bei der Übersetzung ins Deutsche. Diese Arbeit wurde durch das BBSRC finanziell unterstützt (Fördermittel für G.M.).

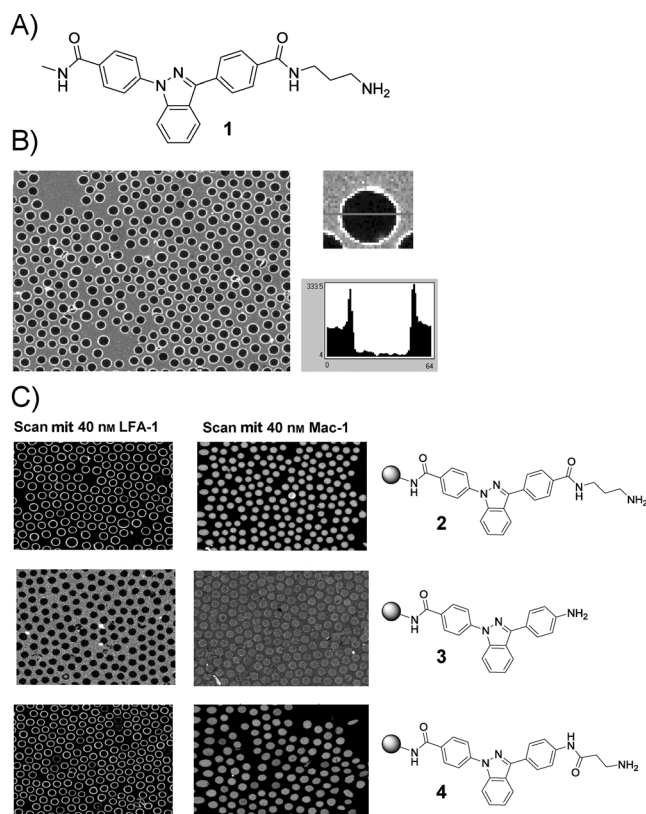
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201310240> zu finden.

© 2014 Die Autoren. Veröffentlicht von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution License, die jede Nutzung des Beitrages in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert wird.

AIDA-markierte OBOC-Bibliotheken



**Schema 1.** Das Konzept zum Screenen von AIDA-markierten OBOC-Bibliotheken: Der 1,3-Diaryl-substituierte Indazolfarbstoff AIDA wird bei der kombinatorischen Festphasensynthese von Substanzbibliotheken als erster Baustein eingeführt. Die einzelnen Verbindungen der Bibliothek aus 1,4-Diazepan-2-onen sind über einen Diaminopropan-Spacer an den Farbstoff gebunden. Nach Inkubieren der Beads mit fluoreszenzmarkierten Zielproteinen wird CONA<sup>[18]</sup> verwendet, um jene Beads mit gebundenem Protein nachzuweisen. Nach Isolierung der Hits dient AIDA als Marker, um die massenspektrometrische Substanzdekodierung zu vereinfachen, und als Reporter für einen sekundären Bindungsassay. Letzterer ermöglicht die Messung der Affinität von AIDA-markierten Hit-Verbindungen mit unmarkiertem Zielprotein in homogener Lösung.



**Abbildung 1.** A) Struktur von Verbindung 1 (IBE-667), identifiziert durch Screening von Bead-basierten Bibliotheken mit fluoreszenzmarkiertem LFA-1 ID. B) CONA-Aufnahme von IBE-667-tragenden Beads nach Inkubation mit 40 nM Cy5-LFA-1 ID. Alle Beads im Sichtfeld zeigen an der Oberfläche gebundenes Protein. Ein Bead und das dazugehörige Ringprofil sind auf der rechten Seite zu sehen. C) On-Bead-Struktur-Aktivitäts-Beziehung und Spezifitätstest: Eine über eine Amidbindung mit AIDA verknüpfte Aminoalkylgruppe ist essentiell für die Bindung an LFA-1 ID. Fluoreszenzmarkiertes MAC1 ID bindet nicht an Beads, die Verbindungen 1, 2, 3 oder 4 an der Oberfläche tragen.

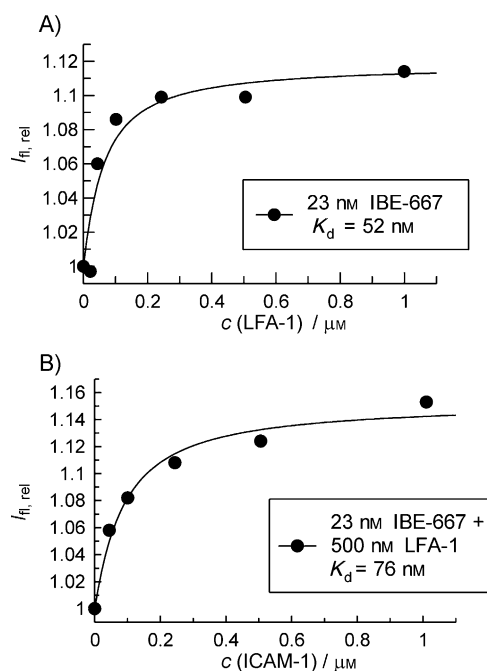
Eines der Merkmale von On-Bead-Screening als einer affinitätsbasierten Screeningmethode ist, dass die identifizierten Liganden unterschiedliche biologische Aktivitätsprofile und Wirkungsweisen haben können. Die Möglichkeit primäre On-Bead-Hits zu bestätigen, indem man ihre Bindungsaktivität für Zielproteine in homogenen Lösungen misst, ist essentiell für das effiziente Screening von OBOC-Bibliotheken.<sup>[19,20]</sup> Wir haben bereits früher zwei Methoden beschrieben, die den effizienten Einsatz von markierten OBOC-Bibliotheken für das On-Bead-Screening erlauben, indem sie Festphasenscreening mit klassischen Assays in homogenen Lösungen kombinieren. Die erste Methode, PS/PS-Markierung, basiert auf der Integration einer generischen Markierungsmethode von Hit-Verbindungen zur In-situ-Fluoreszenzmarkierung nach dem Screeningprozess. Dies erlaubt die anschließende Affinitätsbestimmung von Hits in Lösung ohne vorherige Resynthese.<sup>[21,22]</sup> Bei der zweiten Methode wird schon während der Synthese der Substanzbibliothek jede Verbindung mit einem chemisch stabilen UV-Farbstoff, dem Indazol AIDA, dauerhaft markiert.<sup>[23,24]</sup> AIDA wird anschließend als Marker für die Dekodierung mittels

Massenspektrometrie und für die Affinitätsbestimmung in Lösung verwendet.

Bei den Bemühungen, die AIDA-Technik zur Identifizierung von LFA-1-Liganden anzuwenden, wurde eine auf das Zielprotein abgestimmte Diazepanon-Bibliothek entworfen (Schema 1). Diese Bibliothek enthielt mehr als 75 000 Verbindungen, die durch Standard-Festphasensynthesemethoden auf TentaGel-Beads von 90  $\mu\text{m}$  synthetisiert wurden.

In Übereinstimmung mit bereits publizierten Ergebnissen lieferte das CONA-On-Bead-Screening mit der fluoreszenzmarkierten I-Domäne von LFA-1 (LFA-1 ID) als Zielprotein verschiedene Inhibitoren mit unterschiedlichen Affinitäten und mikro- bis nanomolaren Dissoziationskonstanten ( $K_d$ ) für LFA-1 ID. Allerdings zeigte die nähere Analyse der Massenspektren während der Dekodierung der Hit-Beads auch die Anwesenheit einer Vorläuferverbindung mit einer exakten Masse von 427, welche der Struktur 1 (Abbildung 1 A) entsprechen würde. Die lokale Konzentration oder Dichte von Verbindungen auf der Oberfläche von TentaGel-Beads ist sehr hoch im Vergleich zu den bei Screeningverfahren in homogenen Lösungen üblichen Konzentrationen.

Aus diesem Ergebnis war zu folgern, dass geringfügige bindungsfähige Verunreinigungen während des On-Bead-Screens an das Zielprotein binden können. Verbindung 1 wurde daher erneut synthetisiert, um ihre Bindungsaktivität

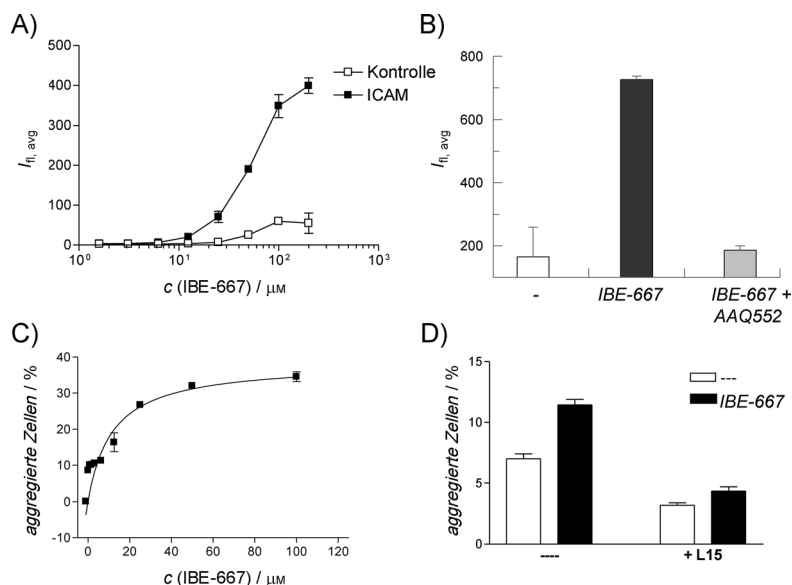


**Abbildung 2.** AIDA-basierte Fluoreszenztitrationskurven A) von IBE-667 mit LFA-1 ID und B) des IBE-667/LFA-1 ID-Komplexes mit löslichem ICAM-1.  $I_{fl,rel}$  = relative Fluoreszenzintensität. A) Zugabe von steigenden Mengen von LFA-1 ID zu 23 nM IBE-667 führt zu einem Anstieg des AIDA-Fluoreszenzsignals. Die Auswertung der experimentellen Daten ergab eine Dissoziationskonstante von  $K_d = 52 \pm 3$  nM. B) Inkubation des vorab gebildeten LFA-1 ID/IBE-667-Komplexes mit steigenden Mengen an löslichem ICAM-1 (sICAM-1) führte zu einem weiteren Anstieg des AIDA-Fluoreszenzsignals. Die Auswertung ergab eine Dissoziationskonstante von  $K_d = 76 \pm 2$  nM für die LFA-1 ID/IBE-667/sICAM-1-Interaktion.

gegenüber der fluoreszenzmarkierten LFA-1 ID mit dem gleichen On-Bead-Screeningassay zu testen. Überraschenderweise zeigte die resynthetisierte AIDA-Alkyldiamin-Struktur **1** eine sehr starke Bindung an das Zielprotein, erkennbar an 100% Ringbildung in der CONA-Aufnahme (Abbildung 1B).

Ein weiterer On-Bead-Aktivitätstest bestätigte zudem, dass die Interaktion zwischen **1** und LFA-1 ID spezifisch ist, denn mit der homologen MAC-1 ID konnte keine Bindung an das Zielprotein nachgewiesen werden (Abbildung 1C). Außerdem ergab die Struktur-Aktivitäts-Analyse, dass die Anwesenheit der Aminoalkyleinheit eine essentielle Voraussetzung für die Bindung ist (Abbildung 1C, vgl. Verbindungen **2** und **3**), während die Inversion der zweiten Amidbindung und eine Verkürzung der Alkylkette um ein C-Atom immer noch in einer Bindung an das Zielprotein resultierten (Abbildung 1C, Verbindung **4**). Um die gefundene Interaktion mit Verbindung **1** in homogener Lösung zu bestätigen, wurden Fluoreszenztitrationen unter Verwendung von unmarkiertem LFA-1 ID als Rezeptor und der AIDA-Fluoreszenzintensität als Signal durchgeführt. Bei der Inkubation von **1** mit LFA-1 ID wurde eine konzentrationsabhängige Zunahme der Fluoreszenzintensität nachgewiesen. Die Auswertung der Bindungsdaten durch Berechnung der Signalkurve ergab eine Dissoziationskonstante von  $K_d = 52$  nm (Abbildung 2A). Als dann lösliches ICAM-1 dem Komplex zugegeben wurde, konnte eine weitere Zunahme der Fluoreszenzintensität bis zur Sättigung beobachtet werden. Wenn Verbindung **1** als ein Inhibitor wirken würde, wäre hier eine Abnahme der Fluoreszenzintensität zu erwarten, da **1** durch ICAM-1 von der Bindungsstelle am LFA-1 ID verdrängt würde. Unsere Daten weisen somit auf ein agonistisches Verhalten von Verbindung **1** bei der Interaktion von LFA-1 ID mit ICAM-1 hin. Die Auswertung der Affinitätsdaten für die Bindung von ICAM-1 an den LFA-1 ID/**1**-Komplex ergab eine Dissoziationskonstante von  $K_d = 76$  nm (Abbildung 2B). Im Vergleich dazu bindet die Niederaffinitätskonformation von LFA-1 an ICAM-1 mit einer Affinität von  $K_d = 1.5$  nm.<sup>[25]</sup>

Anschließend an die Charakterisierung in vitro wendeten wir uns zellulären Untersuchungen zu, um zu bestätigen, dass Verbindung **1** tatsächlich die Bindung von LFA-1 und ICAM-1 stabilisiert. Als erstes wurde mittels FACS (Durchflusszytometrie) die Fähigkeit von **1** untersucht, die Bindung von biotinyliertem löslichem ICAM-1 an aktivierte T-Zellen zu verstärken. Nach Isolierung und In-vitro-Aktivierung von T-Zellen konnte durch Färbung mit Streptavidin-PE eine dosisabhängige Zunahme von biotinyliertem, löslichem ICAM-1 in Anwesenheit von **1** detektiert werden (Abbildung 3A,B). Auch konnte die durch **1** induzierte Affinitätssteigerung von LFA-1 zu ICAM-1 durch die Zugabe des bekannten LFA-1-Inhibitors AAQ552, der in die Mevinolin-Bindungstasche der I-Domäne bindet, komplett aufgehoben werden (Abbil-

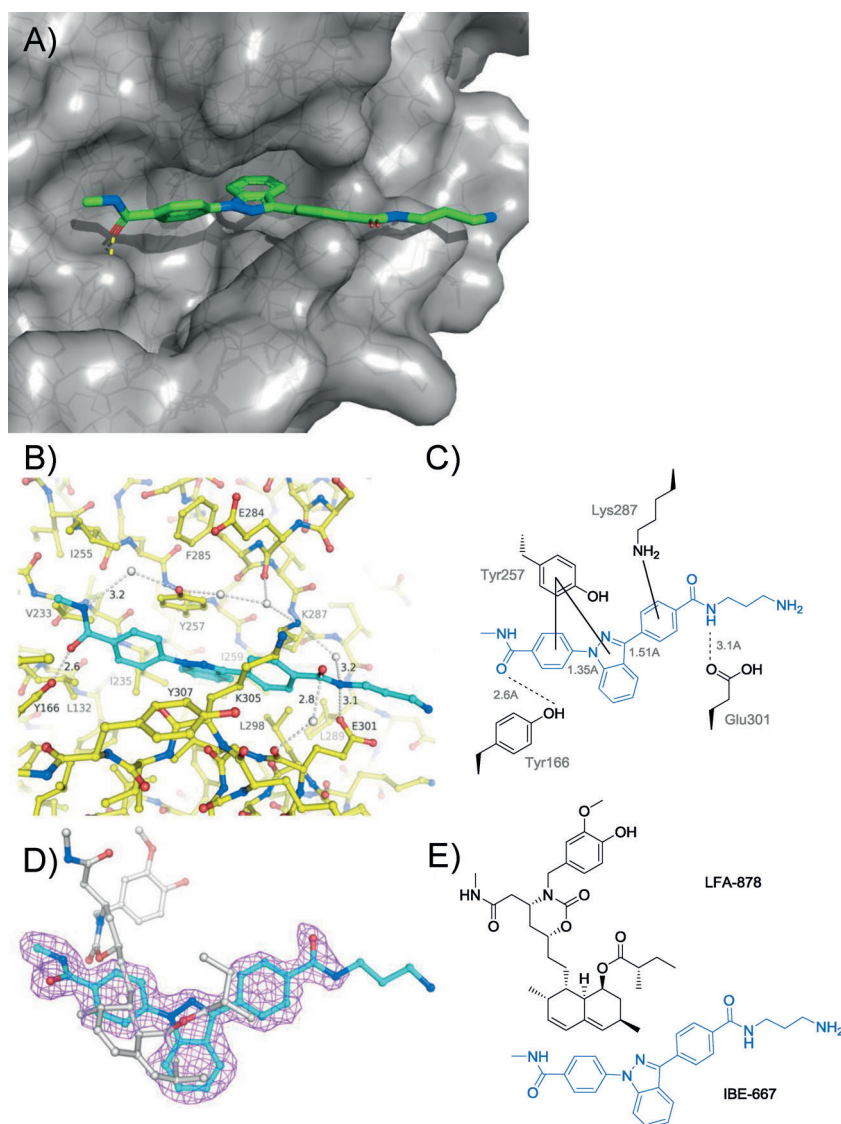


**Abbildung 3.** Aktivität von IBE-667 in zellulären Assays. A) IBE-667 verstärkt die Bindung von biotinyliertem ICAM-1 an aktivierte T-Zellen, gezeigt durch Färbung mit Streptavidin-PE und FACS-Analyse. B) Bindung von ICAM-1 an auf aktivierten T-Zellen exprimiertes LFA-1 in An- und Abwesenheit von IBE-667 und dem LFA-1-Inhibitor AAQ552.  $I_{fl,avg}$  = mittlere Fluoreszenzintensität. C) IBE-667 führt zu einer konzentrationsabhängigen Induktion der T-Zellen-Aggregation nach Aktivierung durch Anti-CD3- und Anti-CD28-Antikörper. D) Die durch IBE-667 induzierte T-Zellen-Aggregation kann durch einen LFA-1-neutralisierenden Antikörper vollständig rückgängig gemacht werden.

dung 3B).<sup>[6]</sup> Zusätzlich zu dieser Fähigkeit, die Bindung von ICAM-1 an aktivierte T-Zellen auszulösen, verstärkte **1** auch die Aggregation von T-Zellen, einen Prozess, der wiederum von der Interaktion zwischen LFA-1 und ICAM-1 abhängt (Abbildung 3C).<sup>[26,27]</sup> Die dosisabhängige Induktion der T-Zellen-Aggregation konnte durch einen monoklonalen Antikörper gegen LFA-1 vollständig blockiert werden (Abbildung 3D). Auf diesen Daten basierend benannten wir unsere neu identifizierte Verbindung ICAM-1 binding enhancer 667 (IBE-667).

Um die strukturelle Basis der Interaktion von IBE-667 mit LFA-1 weiter zu untersuchen, wurden Cokristallisationsexperimente durchgeführt. Der Komplex aus LFA-1 ID und IBE-667 kristallisierte in einer orthorhombischen Kristallform ( $a = 45.3$  Å,  $b = 65.9$  Å,  $c = 133.6$  Å, Raumgruppe  $I222$ ) mit einem Komplex pro asymmetrischer Einheit. Beugungsdaten wurden bis zu einer Auflösung von 1.8 Å gesammelt. Die Kristallstruktur zeigte, dass IBE-667 nicht an die MIDAS-Bindungsstelle von LFA-1 bindet, sondern in die Mevinolin/Lovastatin-Bindungstasche. Der Bindungsmodus von IBE-667 besteht aus zwei wasserstoffbrückenbildenden Gruppen (Amidgruppen), die ein ausgedehntes planares aromatisches System (das bisphenylierte Indazol von AIDA) flankieren (Abbildung 4A,B). Außerdem nimmt die Aminoalkylgruppe, die für die verstärkte ICAM-1-Bindung verantwortlich ist, nicht an der Interaktion mit LFA-1 ID teil. Die beiden flankierenden Amidgruppen bilden direkt Wasserstoffbrücken mit Tyr166-OH und Glu301-OE1, während das Aromatensystem in der Mitte mit dem aromatischen Teil





**Abbildung 4.** Röntgenstruktur von an LFA-1 ID gebundenem IBE-667. A) Überblick über die Cokristallstruktur. IBE-667: grün, Proteinoberfläche: grau. B) Interaktion von IBE-667 in der Mevinolin/Lovastatin-Bindungstasche von LFA-1; C-Atome von LFA-1: gelb, C-Atome von IBE-667: türkis. C) Schema der Hauptinteraktion von IBE-667 und LFA-1. D)  $2F_o - F_c$ -Elektronendichte bei  $1\sigma$  für IBE-667 (C-Atome: türkis) und Überlagerung mit LFA-878 (C-Atome: grau). E) Chemische Struktur von IBE-667 (blau) und dem von Lovastatin abgeleiteten Inhibitor LFA-878. Beide Verbindungen belegen dieselbe Bindungstasche, aber nur IBE-667 wirkt als Agonist.

von Tyr257 und der Seitenkette von Lys287 interagiert (Abbildung 4C). Wahrscheinlich bestimmt besonders die aromatische Interaktion zwischen dem Indazol und Tyr257 den Bindungsmechanismus in entscheidender Weise. Da die Aminoalkylgruppe von IBE-667 nicht direkt mit LFA-1 ID interagiert, ist sie eher flexibel, was sich aus der schwachen Elektronendichte (Abbildung 4D) ableiten lässt. Ein zweiter möglicher Bindungsmechanismus, der mit der pseudo-Spiegelsymmetrie des aromatischen Systems einhergeht, steht aufgrund der leichten Asymmetrie der Bindungslängen zwischen dem Indazol und den zwei benachbarten Phenyleinheiten nicht im selben Ausmaß mit den Elektronendichtedaten im Einklang. Schlussendlich zeigte das Übereinander-

legen der Komplexstrukturen von LFA-1 ID mit IBE-667 und dem von Mevinolin abgeleiteten Inhibitor LFA-878 klar, dass die Bindungsmechanismen dieser beiden Verbindungen unterschiedlicher Natur sind (Abbildung 4D,E).

Insgesamt liefert der Bindungsmechanismus von IBE-667 und die Tatsache, dass die Aminoalkylkette nicht direkt mit LFA-1 interagiert, keine naheliegende Erklärung für die die ICAM-1-Bindung verstärkende Wirkung von IBE-667. Ein Vergleich der LFA-1 ID/IBE-667-Struktur mit bereits früher beschriebenen niedrig-, mittel- oder hochaffinen Cysteinmutanten<sup>[9]</sup> der LFA-1 ID zeigte, dass nur ähnlich kleine Abweichungen in der  $\alpha$ 7-Helix der LFA-1 ID vorliegen. Allerdings verursacht die Bindung von Mevinolin an LFA-1 ID, welches dieselbe Bindungsstelle wie IBE-667 belegt, ähnliche kleine Änderungen mit entgegengesetzten Konsequenzen.<sup>[28]</sup> Darüber hinaus konnte, ähnlich wie bei Mevinolin, keine Änderung innerhalb der MIDAS-Bindungsstelle infolge der Bindung von IBE-667 an LFA-1 ID beobachtet werden. Das lässt vermuten, dass die von IBE-667 induzierte, gesteigerte Affinität von LFA-1 ID an ICAM-1 auf kinetische Effekte, z.B. Unterschiede in den Assoziationsgeschwindigkeiten, zurückzuführen ist. Die zusätzliche Ladung, die durch die Aminoalkylgruppe von IBE-667 eingebracht wird, könnte ebenfalls einen dahingehenden Einfluss haben.

Zusammenfassend beschreiben wir hier die Identifizierung von IBE-667, einem LFA-1-Agonisten, der die Affinität von LFA-1 für ICAM-1 erhöht. Die Verbindung wurde durch CONA-On-Bead-Screening einer markierten OBOC-Bibliothek identifiziert. IBE-667 ist zwar ein Vorläufer des ursprünglichen Bibliothekdesigns, zeigt aber erneut die Flexibilität des On-Bead-Screenings für die kostengünstige Identifizierung von biologisch

aktiven Liganden in hochminiaturisierter Form. Zudem demonstrieren die Resultate die Vorteile von markierten Substanzbibliotheken: Die entscheidende Bestätigung der Interaktion unserer Hit-Verbindung mit dem Zielprotein in homogener Lösung, ebenso wie die Aufklärung der molekularen Wirkungsweise, wird durch den generischen und sensitiven fluoreszenzbasierten Assay, welchen die markierten Substanzen ermöglichen, deutlich erleichtert. Allerdings zeigt dieses Ergebnis auch, dass die AIDA-Reportergruppe selbst nicht interaktionsinert ist. Aus diesem Grund haben wir bereits eine neue Variante des markierten Bibliothekansatzes beschrieben, bei der die Markierung erst nach dem ursprünglichen on bead Screeningschritt eingeführt wird, sodass

die Markierung zwar als Reporter für den Lösungsassay verwendet wird, nicht aber das entscheidende Reaktionselement darstellen kann.<sup>[21]</sup> Abschließend nehmen wir an, dass die Erkenntnisse aus der LFA-1 ID/IBE-667-Cokristallstruktur einen wertvollen Ausgangspunkt für ein optimiertes Design von neuen LFA-1-Inhibitoren darstellen. LFA-1-Aktivatoren könnten Möglichkeiten für eine effizientere Tumormimmuntherapie eröffnen. Schließlich könnte die Steigerung der LFA-1/ICAM-1-Affinität durch niedermolekulare PPI-Stabilisatoren Mängel in der LFA-1-Expression oder -Aktivierung ausgleichen, welche die Ursache für das LAD-Syndrom sind.

Eingegangen am 26. November 2013

Online veröffentlicht am 1. April 2014

**Stichwörter:** Hochdurchsatz-Screening · LFA-1 ·  
Niedermolekulare Aktivatoren · OBOC-Bibliotheken ·  
Strukturbiologie

- [1] Y. R. Carrasco, S. J. Fleire, T. Cameron, M. L. Dustin, F. D. Batista, *Immunity* **2004**, *20*, 589–599.
- [2] R. Evans, A. C. Lellouch, L. Svensson, A. McDowall, N. Hogg, *Blood* **2011**, *117*, 3331–3342.
- [3] K. Ley, C. Laudanna, M. I. Cybulsky, S. Nourshargh, *Nat. Rev. Immunol.* **2007**, *7*, 678–689.
- [4] I. R. Badell, M. C. Russell, P. W. Thompson, A. P. Turner, T. A. Weaver, J. M. Robertson, J. G. Avila, J. A. Cano, B. E. Johnson, M. Song, F. V. Leopardi, S. Swygert, E. A. Strobert, M. L. Ford, A. D. Kirk, C. P. Larsen, *J. Clin. Invest.* **2010**, *120*, 4520–4531.
- [5] M. E. Anderson, T. J. Siahaan, *Peptides* **2003**, *24*, 487–501.
- [6] S. Wattanasin, J. Kallen, S. Myers, Q. Guo, M. Sabio, C. Ehrhardt, R. Albert, U. Hommel, G. Weckbecker, K. Welzenbach, G. Weitz-Schmidt, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 1217–1220.
- [7] G. Weitz-Schmidt, S. Chreng, S. Riek, *Mol. Pharmacol.* **2009**, *75*, 355–362.
- [8] Q. Ma, M. Shimaoka, C. Lu, H. Jing, C. V. Carman, T. A. Springer, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 10638–10641.
- [9] M. Shimaoka, T. Xiao, J.-H. Liu, Y. Yang, Y. Dong, C.-D. Jun, A. McCormack, R. Zhang, A. Joachimiak, J. Takagi, J. H. Wang, T. A. Springer, *Cell* **2003**, *112*, 99–111.
- [10] D. L. Boger, J. Goldberg, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 557–562.
- [11] C. L. Erickson-Miller, E. DeLorme, S.-S. Tian, C. B. Hopson, K. Stark, L. Giampa, E. I. Valoret, K. J. Duffy, J. L. Luengo, J. Rosen, S. G. Miller, S. B. Dillon, P. Lamb, *Exp. Hematol.* **2005**, *33*, 85–93.
- [12] S. E. Cwirla, P. Balasubramanian, D. J. Duffin, C. R. Wagstrom, C. M. Gates, S. C. Singer, A. M. Davis, R. L. Tansik, L. C. Matheakis, C. M. Boytos, P. J. Schatz, D. P. Baccanari, N. C. Wrighton, R. W. Barrett, W. J. Dower, *Science* **1997**, *276*, 1696–1699.
- [13] C. Anders, Y. Higuchi, K. Koschinsky, M. Bartel, B. Schumacher, P. Thiel, H. Nitta, R. Preisig-Müller, G. Schlichthörl, V. Renigunta, J. Ohkanda, J. Daut, N. Kato, C. Ottmann, *Chem. Biol.* **2013**, *20*, 583–593.
- [14] P. Thiel, M. Kaiser, C. Ottmann, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 2052–2059; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 2012–2018.
- [15] A. Zarbock, T. Kempf, K. Wollert, D. Vestweber, *J. Mol. Med.* **2012**, *90*, 353–359.
- [16] J. Nagendran, C. Prakash, L. Anandakrishna, D. Gaviappa, D. Ganesh, *J. Dent. Child.* **2012**, *79*, 105–110.
- [17] W. Yang, C. V. Carman, M. Kim, A. Salas, M. Shimaoka, T. A. Springer, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 37904–37912.
- [18] M. Hintersteiner, C. Buehler, V. Uhl, M. Schmied, J. Muller, K. Kottig, M. Auer, *J. Comb. Chem.* **2009**, *11*, 886–894.
- [19] D. Pei, *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 3–4.
- [20] N. C. Meisner, M. Hintersteiner, V. Uhl, T. Weidemann, M. Schmied, H. Gstach, M. Auer, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 424–431.
- [21] M. Hintersteiner, T. Kimmerlin, F. Kalthoff, M. Stoeckli, G. Garavel, J.-M. Seifert, N.-C. Meisner, V. Uhl, C. Buehler, T. Weidemann, M. Auer, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 724–735.
- [22] M. Hintersteiner, A. Knox, G. Mudd, M. Auer, *J. Chem. Biol.* **2012**, *5*, 63–79.
- [23] M. Hintersteiner, G. Ambrus, J. Bednenko, M. Schmied, A. J. S. Knox, N.-C. Meisner, H. Gstach, J.-M. Seifert, E. L. Singer, L. Gerace, M. Auer, *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5*, 967–979.
- [24] N.-C. Meisner, M. Hintersteiner, J.-M. Seifert, R. Bauer, R. M. Benoit, A. Widmer, T. Schindler, V. Uhl, M. Lang, H. Gstach, M. Auer, *J. Mol. Biol.* **2009**, *386*, 435–450.
- [25] M. Shimaoka, M. Kim, E. H. Cohen, W. Yang, N. Astrof, D. Peer, A. Salas, A. Ferrand, T. A. Springer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 13991–13996.
- [26] Y. van Kooyk, P. Weder, F. Hogervorst, A. J. Verhoeven, G. van Seventer, A. A. te Velde, J. Borst, G. D. Keizer, C. G. Figdor, *J. Cell Biol.* **1991**, *112*, 345–354.
- [27] G. Koopman, Y. van Kooyk, M. de Graaff, C. J. Meyer, C. G. Figdor, S. T. Pals, *J. Immunol.* **1990**, *145*, 3589–3593.
- [28] J. Kallen, K. Welzenbach, P. Ramage, D. Geyl, R. Kriwacki, G. Legge, S. Cottens, G. Weitz-Schmidt, U. Hommel, *J. Mol. Biol.* **1999**, *292*, 1–9.
- [29] Z. Otwinowski, W. Minor, *Methods in Enzymology*, 276: *Macromolecular Crystallography, Part A*, Elsevier, Amsterdam **1997**, *S*, 307–326.
- [30] G. Weitz-Schmidt, K. Welzenbach, J. Dawson, J. Kallen, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 46764–46771.
- [31] T. A. Jones, J. Y. Zou, S. W. Cowan, M. Kjeldgaard, *Acta Crystallogr. Sect. A* **1991**, *47*, 110–119.
- [32] G. N. Murshudov, A. A. Vagin, E. J. Dodson, *Acta Crystallogr. Sect. D* **1997**, *53*, 240–255.