

Fluorescence-based Assay System for Endocannabinoid Degradation Enzyme, Fatty Acid Amide Hydrolase

Dae-Woong Kim¹, Gun-Joong Kim², Hae-Jo Kim² and Sung-Ho Ghil^{1,†}

¹Department of Life Science, Kyonggi University, Suwon 443-760, Korea

²Department of Chemistry, Hankuk University of Foreign Studies, Yongin 449-791, Korea

Endogenous cannabinoids (endocannabinoids) display various pharmacological effects including pain control, anti-inflammation, and neuroprotection. The synthesis and release of endocannabinoids are regulated under both physiological and pathological conditions. The main degrading enzyme of endocannabinoid is fatty acid amide hydrolase (FAAH). Therefore we have developed the fluorescence-based assay system for FAAH. We established stable CosM6 cell lines expressing human FAAH. We also synthesized 2-oxo-2H-chromen-7-yl decanoate (DAEC) as a fluorogenic substrate for FAAH. When crude membrane extracts stably expressing FAAH was incubated with DAEC at 25°C, FAAH reacted specifically to DAEC and catalyzes the hydrolysis of DAEC into decanoic acid and highly fluorescent coumarin. Furthermore, the serin hydrolase inhibitor, phenylmethanesulfonyl fluoride, inhibited the coumarin release to the reaction buffer in concentration dependent manner. This assay system is suitable for high-throughput screening since this system has simple experimental procedure and measurement method.

Key Words: Fatty acid amide hydrolase; Cannabinoid; High throughput screening; Fluorescent assay; Enzymatic assay; Esterase

서 론

대마 (*Cannabis sativa*)는 통증이나 구토, 근육경련, 불면증 등에 관련된 60여종의 생리활성 물질을 함유하고 있고, 대마의 핵심성분으로는 카나비노이드 (cannabinoid)가 알려져 있다. 최근 동물의 뇌조직에서 식물의 카나비노이드 성분과 유사한 5종류의 내인성카나비노이드 (endogenous cannabinoid, endocannabinoid)가 분리되었으며 (Bisogno et al., 2005), 항암작용을 비롯한 통증제어, 뇌손상 복구작용, 감염억제작용 등의 다양한 약리학적 효과가 확인되었다 (Hohman et al., 2006). 내인성카나비노이드는 모두 아라키돈산 (arachidonic acid)으로부터 생성되며, 생리적 또는 병리적인 상황 하에서 생체내에서 합성 및 분비되고 주로 FAAH (fatty acid amide hydrolase)에 의해 생분해된다고 알려져 있다. 내인성카나비노이드의 신호

를 세포내로 매개하는 카나비노이드 수용체 (CBR)는 두 종류가 존재한다고 알려져 있다. CBR1은 주로 뇌조직에서 발현되며, CBR2는 주로 면역계 조직에서 발현된다 (Matsuda et al., 1990; Munro et al., 1993). 이들은 모두 G 단백질연관수용체 (G-protein coupled receptor)의 일종이며 Gi/Go의 heterotrimeric G 단백질과 연결되어 있다.

현재 임상적으로 카나비노이드 작용약 (agonist)을 암의 화학요법, 통증제어, 감염억제, 뇌질환의 제어 등의 치료 약물로 사용하려는 시도가 있으나, 직접적인 카나비노이드 작용약의 약물투여는 심각한 부작용 (운동능력장애, 환각증상, 약물에 대한 중독성, 내성, 의존형성 등)을 나타내기 때문에 이용에 한계가 있다. 따라서 최근에는 카나비노이드 작용약의 약물투여 보다는 자연적으로 생체내에서 합성·분비되는 내인성카나비노이드를 이용하고자 하는 연구가 진행되고 있다. 즉, 조직내에서 내인성 카나비노이드의 농도를 조절할 수 있는 효소를 발굴하여 그 효소의 활성을 조절함으로써 그 약리학적 효과를 관찰하는 것이다. 그 중에서 연구가 활발하게 진행되고 있는 부분이 내인성카나비노이드의 조직내 분해를 유도할 수 있는 효소의 발굴과 그 효소의 활성억제기술 개발이며, 이러한 시도가 '카나비노이드-기반 치료법'의 새로

*접수일: 2010년 10월 29일 / 수정일: 2010년 12월 2일
채택일: 2010년 12월 10일

†교신저자: 김성호, (우) 443-760 경기도 수원시 영통구 의의동,
경기대학교 생명과학과
Tel: 031-249-9646, Fax: 031-249-9646
e-mail: shghil@kgu.ac.kr

운 대안으로 부각되고 있다. 실제로, 내인성카나비노이드 분해효소의 활성을 억제하였을 때, 카나비노이드의 약리학적 효과를 그대로 유지시키면서 카나비노이드 약물투여시 보이는 부작용이 발생되지 않음이 최근 입증되었다 (Cravatt et al., 2004; Jayamanne et al., 2006; Labar and Michaux, 2007). FAAH 결여생쥐를 대상으로 수행된 연구에 의하면, FAAH 결여생쥐는 정상생쥐에 비해 뇌조직에서의 내인성카나비노이드의 발현량이 1000% 정도 그리고 신장에서는 150% 가량 증가되어 있었으며, 통증에 대해 매우 둔감한 형태를 보였다 (Labar and Michaux, 2007). 이러한 결과는 FAAH의 활성억제가 내인성카나비노이드의 조직내 농도를 증가시킬 수 있고, 이를 통해 카나비노이드의 약리학적 효과를 기대할 수 있음을 강력히 시사한다. 현재까지 몇 종류의 FAAH 활성억제가 개발되어 있다. 그러나 이들 중 일부는 FAAH에 비가역적 공유결합을 형성하고, 물에 대한 용해도가 낮고, FAAH와의 특이성이 낮은 관계로 아직까지는 약제로 사용되기에는 부적합한 단점을 가지고 있다 (Ahn et al., 2007; Zhang et al., 2007; Timmons et al., 2008).

활성억제제 발굴을 위해서는 화합물 및 천연물 라이브러리 (library) 등을 대상으로한 대단위 스크리닝 (screening)이 가능한 활성분석 시스템이 반드시 요구되나, 아직까지 이와 같이 우수한 활성분석 시스템은 개발되지 못하였다. 따라서 본 연구에서는 이와 같은 것이 가능한 FAAH의 활성분석 시스템을 구축하고자 하였다. 특히 본 연구에서 주안점을 두었던 사항은 한번에 많은 양의 시료를 검색할 수 있는 고속처리검색 (high-throughput screening)이 가능한 활성분석 시스템 구축이었다. 이에 본 연구에서는 FAAH에 특이적으로 반응하는 형광기질을 개발하여 활성분석 시스템을 구축하여 향후 이를 이용한 화합물 및 천연물 라이브러리 등을 대상으로 대단위 스크리닝이 가능할 것으로 사료된다.

재료 및 방법

2-oxo-2H-chromen-7-yl decanoate (DAEC) 기질 합성

Decanoic acid를 methylene chloride에 용해시켜 oxalyl chloride를 첨가한 후 촉매로 dimethyl formamide를 사용하여 질소기체 조건에서 5시간 동안 상온에서 반응시켰다. 추가적으로 7-hydroxycoumarin과 triethylamine를 첨가하여 0°C 조건에서 12시간 반응시켰다. 생성된 침전물은 N-hexane으로 수세하여 여과시켰다. 반응물을 Silica

column을 통해 분획하여 thin layer chromatography를 통해 확인한 후, 자기공명장치를 이용한 분석을 실시하여 화합물 합성 여부를 확인하였다. 합성물을 dimethyl sulfoxide (DMSO)로 용해한 후 다음 실험에 사용하였다.

세포주 배양 및 transfection

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Hyclone, South Logan, UT)에 10% 우태아혈청과 1% penicillin, 100 µg/ml streptomycin을 첨가하여 293T 및 CosM6 세포를 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였으며, 2~3일에 한번씩 HBSS (Hyclone)로 씻어낸 후 0.25% trypsin-EDTA 용액 (Hyclone)을 사용하여 세포를 배양용기의 바닥으로부터 분리시켜 계대 배양하였다 (Ghil et al., 2006). 293T 세포의 transfection은 100 mm 배양용기 당 1.5×10^6 세포수로 분주한 후, 18~24시간 동안 배양한 후 calcium-phosphate 방법을 사용하여 실시하였다 (Ghil et al., 2006). 이 방법을 간단히 설명하면, 적당량의 발현벡터를 62 µl의 2 M CaCl₂와 함께 혼합하여 동량의 2× HBS (50 mM Hepes pH 7.1, 280 mM NaCl, 1.5 mM Na₂HPO₄)를 혼합하였다. 이 DNA 혼합용액을 30분간 상온에 정지한 후, 세포 배양액에 첨가하여 반응시켰다. CosM6 세포의 transfection은 100 mm 배양용기 당 1.5×10^6 개의 세포를 18~24시간 배양한 후, Polyethylenimine (PEI, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO)를 이용하여 세포에 발현벡터를 삽입하였다 (Ghil et al., 2006). 간단히 이 방법을 설명하면, 적당량의 발현벡터를 DMEM과 혼합하여 800 µl가 되게 한 후, 20 µg PEI를 첨가했다. 이 용액을 30분간 상온에서 방치한 후, 세포 배양액에 한 방울씩 떨어뜨려 반응시키고 40시간 후에 인산염완충액 (10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl)으로 2회 수세한 후, 세포를 수집하여 다음 실험에 사용하였다.

FAAH 발현벡터 및 발현확인

실험에 사용한 FAAH 발현벡터 (pcDNA3.1/myc-His-FAAH)는 The Scripps Research Institute의 Cravatt 박사로부터 공여 받아 사용하였다 (Cravatt et al., 1996). 이 벡터를 293T 세포에 transfection하고 40시간 후, 세포를 수거하여 PBTX 용액 (1% Triton X-100과 단백질 분해효소 억제제가 첨가된 인산염완충액)에 1시간 반응시킨 후, 세포추출액을 얻어 단백질 전기영동을 수행하였다. 전기영동된 단백질을 poly-vinyl difluoride membrane에 옮겨 His-항체 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)를 사용하여

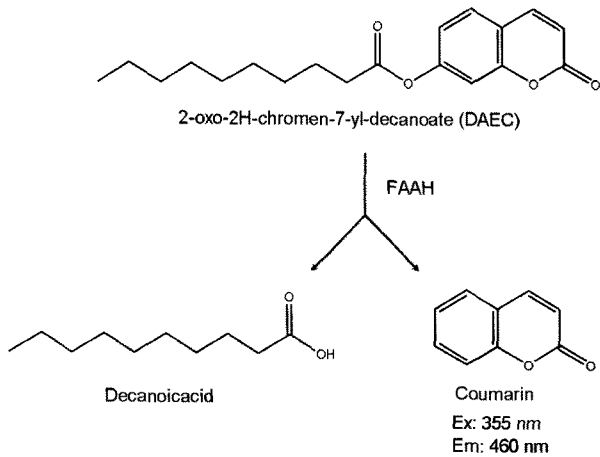


Fig. 1. Mechanism schematic of FAAH reaction which catalyzes the hydrolysis of DAEC into decanoic acid and coumarin. Amount of fluorescent that release of coumarin by hydrolysis was monitored dependent time with excitation at 355 nm and emission at 460 nm.

Western blot 분석을 수행하였다.

FAAH 안정적 발현세포주 (stable cell line)의 확립

100 mm 배양용기당 1.5×10^6 개의 CosM6 세포를 분주하고 10 μ g의 FAAH 발현벡터를 transfection하여 40시간 후부터 1.2 mg/ml의 Geneticin (GIBCO, Carlsbad, CA)을 처리하였다. 2주 후에 세포를 수거하여 His-항체를 사용하여 Western blot 분석을 수행하여 FAAH 안정적 발현세포주의 확립 여부를 조사하였다.

세포추출액의 분리

FAAH는 주로 세포막에 발현하는 특성을 보이기 때문에 세포추출액으로 crude membrane을 다음과 같이 추출하여 사용하였다. FAAH 안정적 발현세포주를 수거하여 세포분쇄용액 (50 mM HEPES pH 7.4, 1 mM EDTA, 단백질 분해효소 억제제 첨가)으로 부유시켜 15초의 간격으로 10초간 초음파분쇄기로 5회 분쇄하였다. 분쇄한 세포를 원심분리 (12,000 rpm, 20분, 4°C)하여 침전물을 부유용액 (50 mM HEPES pH 7.4, 1 mM EDTA)으로 부유시켜 사용시까지 -70°C에 보관하였다.

세포추출액과 DAEC 기질의 반응

반응용액 (50 mM HEPES pH 7.4, 1 mM EDTA, 0.1% NP40)에 세포추출액 1 μ g과 각기 다른 농도의 DAEC 기질을 첨가하여 용액의 총 부피가 21 μ l가 되게 조성하고 384 black plate를 이용하여 형광강도 측정기 (VICTOR™X2, Perkinelmer, Waltham, MA)를 이용하여

25°C에서 100분 동안 5분 간격으로 형광강도를 측정하였다. 결과값에 대한 분석은 Microsoft Excel 프로그램과 GraphPad prism (version 5.01)을 이용하였다.

활성억제제의 처리

반응액에 세포추출액 1 μ g과 각기 다른 농도의 PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride, USB, Cleveland, OH)를 25°C에서 1시간 동안 전처리한 후, 300 μ M의 DAEC 기질을 첨가하여 형광강도 측정기로 형광강도를 측정하였다.

결 과

FAAH의 활성분석 시스템을 구축하기 위해 본 연구에서는 FAAH의 형광기질로서 decanoic acid와 coumarin을 ester 결합으로 합성한 DAEC 기질을 제작하였다 (Fig. 1).

FAAH의 발현벡터가 세포내에서 적절하게 단백질을 발현시킬 수 있는지를 확인하기 위해 293T 세포에 발현벡터를 일시적으로 발현시켜 Western blot 분석을 통해 확인한 결과, 세포내에서 성공적으로 발현됨을 확인하였다 (Fig. 2A). CosM6 세포에 FAAH 안정적 발현세포주를 제작하기 위해 발현벡터를 발현시킨 후, Geneticin을 처리하여 FAAH를 발현하는 세포만을 선별한 후, Western blot 분석을 통해 FAAH의 발현 여부를 확인하였다. 그 결과 CosM6 세포에 FAAH가 안정적으로 발현됨을 확인하였다 (Fig. 2B). FAAH는 세포막에 잘 발현되는 단백질이라는 것이 이미 알려져 있으므로 (Ueda et al., 2000; Bracey et al., 2002), 본 연구에서는 FAAH 안정적 발현세포주의 crude membrane 분획만을 추출하여 실험에 이용하였다. 세포추출액 1 μ g과 300 μ M의 DAEC 기질을 반응시킨 후, 반응시간에 따른 형광강도를 형광강도 측정기로 측정할 결과, FAAH 안정적 발현세포주 추출물 (CosM6-FAAH)을 이용하였을 경우가 대조군 세포 (CosM6)의 추출물을 이용했을 때 보다 반응시간-의존적인 형광 세기 (RFU)의 증가양상이 뚜렷하게 보임을 확인하였다 (Fig. 2C). 이때 반응액에 세포추출물을 제외한 기질만 첨가한 경우 (Buffer) 기질의 분해는 거의 일어나지 않음을 확인할 수 있었다. 반응시간 40분에서 DAEC 기질에 대한 FAAH의 활성을 그래프로 나타낸 결과, FAAH 안정적 발현세포주 추출액이 존재할 때 FAAH의 활성이 대조군 세포추출액 및 세포추출액이 없는 조건에 비해 월등히 높게 나타남을 확인하였다 (Fig. 2D). 이러한 효소의 활성값은 coumarin의 다양한 농도조건에서 나타난 형광값으로 그

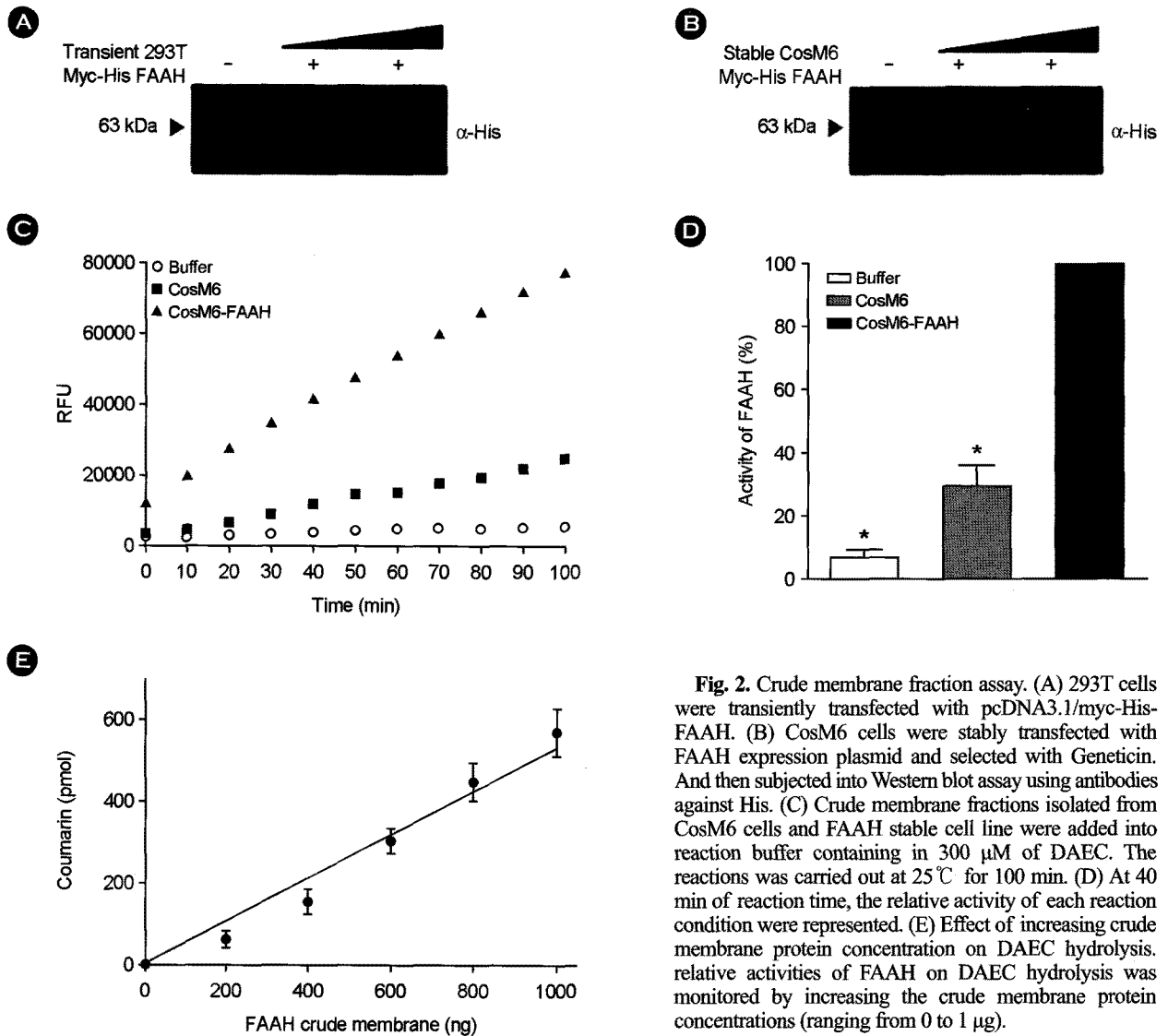


Fig. 2. Crude membrane fraction assay. (A) 293T cells were transiently transfected with pcDNA3.1/myc-His-FAAH. (B) CosM6 cells were stably transfected with FAAH expression plasmid and selected with Geneticin. And then subjected into Western blot assay using antibodies against His. (C) Crude membrane fractions isolated from CosM6 cells and FAAH stable cell line were added into reaction buffer containing in 300 μ M of DAEC. The reactions was carried out at 25 $^{\circ}$ C for 100 min. (D) At 40 min of reaction time, the relative activity of each reaction condition were represented. (E) Effect of increasing crude membrane protein concentration on DAEC hydrolysis. relative activities of FAAH on DAEC hydrolysis was monitored by increasing the crude membrane protein concentrations (ranging from 0 to 1 μ g).

린 standard curve의 1차 방정식에 효소와 기질의 반응을 유도하여 나타난 형광값을 대입하여 coumarin의 양으로 환산하여 나타내었다. 반응액에 효소의 농도를 증가시켜 기질과 반응시켰을 경우, FAAH 활성이 효소농도-의존적으로 증가함을 확인하였다 (Fig. 2E). 이러한 결과를 통해 DAEC는 FAAH의 활성을 직접적으로 측정할 수 있는 적절한 형광기질임을 확인하였다.

DAEC 기질이 FAAH에 의해 분해되는 동역학적인 특성을 확인하기 위해, FAAH 안정적 발현세포주 추출액 1 μ g을 각기 다른 농도의 DAEC 기질과 반응시킨 후 Michaelis-Menten 방정식을 사용하여 Km 및 Vmax 수치를 산출하였다. 그 결과 Km 및 Vmax 수치는 각각 540 μ M과 37.6 nmol/mg protein/min이었다 (Fig. 3A). 또한 Lineweaver-Burk 방정식을 이용하여 그래프로 나타내었다

(Fig. 3B).

본 연구에서는 FAAH와 DAEC의 특이적 반응 여부를 조사하기 위해 serin hydrolase 억제제인 PMSF를 농도를 증가시키며 반응액에 첨가하여 FAAH의 활성을 조사하였다. 그 결과 PMSF의 처리농도가 증가함에 따라 FAAH의 활성에 따른 DAEC의 가수분해 과정에서 생성되는 coumarin의 형광강도가 점차 감소함을 확인하였다. 이는 FAAH와 DAEC 기질이 특이적으로 반응함을 확인할 수 있었다 (Fig. 4).

고 찰

지금까지 개발된 FAAH의 활성분석 시스템에서는 기질로서 거의 대부분 방사성동위원소를 이용하였다. 이

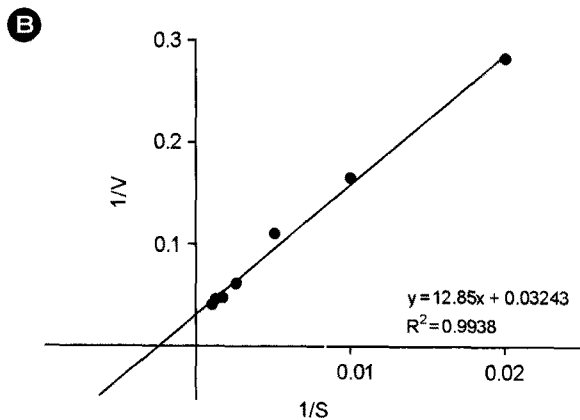
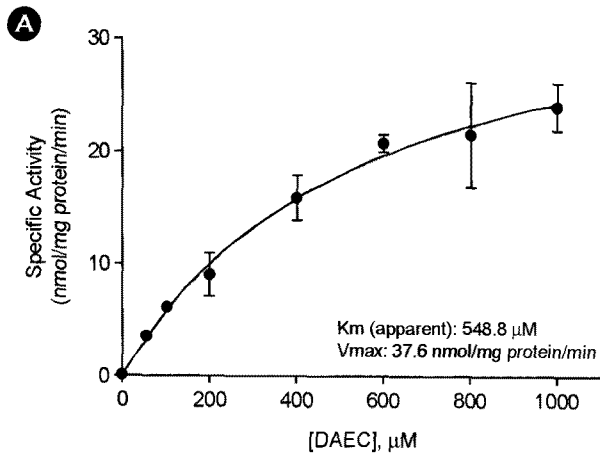


Fig. 3. Kinetics of DAEC hydrolysis by FAAH. (A) FAAH activity was assayed at various DAEC concentrations. FAAH crude membranes (1 μg) were incubated with increasing DAEC concentrations for 40 min in a total volume 21 μl in a 384-well black plate. The data were analyzed using GraphPad Prism based on the Michaelis-Menten equation. (B) Lineweaver-Burk plot of DAEC hydrolysis by FAAH crude membranes.

용된 방사성동위원소는 [³H]-anandamide이었으며, 효소와 반응시킨 후 결과물들을 chromatography 방법 또는 scintillation counter를 이용하여 측정하였다 (Deutsch and Chin, 1993; Omeir et al., 1995; Maccarrone et al., 1999; Wilson et al., 2003; Boldrup et al., 2004). 그러나 이 방법은 실험방법이 복잡하고 방사성동위원소를 사용해야 한다는 단점이 있어 고속처리검색을 수행하기에는 부적합하다. 또한 발색기질인 decanoyl-para nitroanilide를 사용하여 흡광도를 측정하는 방법도 개발되었으나 (Patricelli and Cravatt, 2001) 효소-기질간의 민감도가 낮으며, 이 분석 시스템으로는 색을 띄는 화합물을 스크리닝할 수 없다는 단점을 가지고 있다. 최근에 두 가지 효소와 두 가지 기질을 이용하여 FAAH의 활성을 분석할 수 있는 시스템이 개발되었으나 (De Bank et al., 2005), 이 역시 실험방법이 상

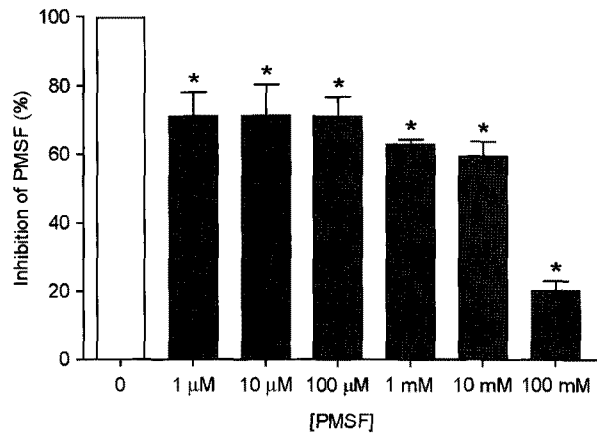


Fig. 4. Inhibition of PMSF which is serine hydrolase inhibitor. The crude membrane fraction from stably expressed human FAAH (1 μg) was pre-incubated with ranged from 1 μM to 100 mM PMSF at 25 °C for 1 hr. Then 300 μM DAEC substrate were added into loaded reaction samples and the release of fluorescence was monitored at 200 min.

대적으로 복잡하고 두 가지 효소의 사용에 의한 간접현상이 발생할 가능성이 지적되고 있어 고속처리검색을 수행하기에는 부적절하다. 최근 형광기질인 arachidonyl 7-amino-4-methyl coumarin을 이용하여 본 연구와 유사하게 형광강도 측정기를 이용한 측정법이 개발되었으나 (Ramarao et al., 2005), 기질의 용해도가 매우 낮아 사용에 제한적이다. 이러한 문제점을 극복하고자 본 연구에서는 기질의 용해도를 높일 수 있도록 기질의 탄소수를 낮추었으며, 또한 최근 밝혀진 FAAH의 특성이 amidase 기능 외에 esterase의 기능이 있음을 참고하여 decanoic acid와 coumarin의 결합을 ester 결합이 되도록 기질을 제작하였다. 본 연구팀에 의해 제작된 형광기질인 DAEC는 FAAH와 반응하지 않으면 형광을 발하지 않았으며, 반응액에 FAAH-안정적 발현세포주의 추출물을 반응시켰을 때 DAEC 형광기질이 분해되어 형광강도의 세기가 증가함을 관찰하였다 (Fig. 2D와 2E). 따라서 DAEC 형광기질과 FAAH는 특이적으로 반응함을 알 수 있었다.

현재까지 알려진 FAAH의 생체내 기질은 거의 탄소 20개의 아라키돈산의 유도체이다. 아라키돈산은 4개의 cis-이중결합을 형성하고 있고, 그들간의 반테르발스 힘에 의해 접힌 형태로 존재할 가능성이 크다. 이점에 착안하여, 본 연구에서는 탄소 10개 포화지방산인 decanoic acid를 기질로 사용하였다. FAAH의 활성부위에 접힌 형태의 아라키돈산이 결합하는 것이 decanoic acid와 유사할 것이라고 판단하였기 때문이다. 그러나 효소와 기질을 반응시켜 이들 간의 친화력을 Michaelis-Menten 방정식

을 이용하여 구한 결과 Km이 548.8 μ M로 나타났다. 이는 아라키돈산을 이용한 타 연구와 비교하면 비교적 높지 않은 친화력을 보인다. 본 연구에서 직접적으로 아라키돈산을 주형으로 제작된 기질을 이용하여 서로의 친화력을 비교한 것은 아니지만, FAAH의 활성부위에 아라키돈산이 decanoic acid보다 효과적으로 결합한다는 점을 시사한다. 그러나 DAEC는 기존에 개발되어진 기질이 모두 아라키돈산과 형광물질 혹은 발색물질이 amide 결합을 통해 연결되어진 구조를 갖는데 반해 DAEC는 decanoic acid와 형광물질이 ester 결합을 가지고 있어 FAAH의 esterase 활성을 이용한 최초의 기질이기에 때문에 그 가치는 높을 것으로 판단된다.

본 연구에서는 FAAH에 특이적인 형광기질인 DAEC를 개발하여 FAAH 활성분석 시스템을 구축하였다. 특히 DAEC 형광기질은 자체적으로 형광을 발하지 않으나 이들이 FAAH와 특이적으로 반응하면 반응물에서 형광물질인 coumarin이 검출되기 때문에 FAAH의 활성을 형광강도 측정기로 쉽게 측정할 수 있으며 기질의 용해도도 우수하고 실험 방법이 매우 간단하기 때문에 고속처리검색에 적합하다. 이 분석 시스템은 향후 FAAH의 활성 억제제를 천연물 및 화합물 라이브러리를 이용해 탐색·발굴하는데 유용하게 사용할 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 2009년도 정부 (교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 기초연구사업 지원을 받아 수행된 것임 (2009-0072938).

REFERENCES

- Ahn K, Johnson DS, Fitzgerald LR, Liimatta M, Arendse A, Stevenson T, Lund ET, Nugent RA, Nomanbhoy TK, Alexander JP, Cravatt BF. Novel mechanistic class of fatty acid amide hydrolase inhibitors with remarkable selectivity. *Biochemistry* 2007. 46: 13019-13030.
- Bisogno T, Ligresti A, Di Marzo V. The endocannabinoid signalling system: biochemical aspects. *Pharmacol Biochem Behav.* 2005. 81: 224-238.
- Boldrup L, Wilson SJ, Barbier AJ, Fowler CJ. A simple stopped assay for fatty acid amide hydrolase avoiding the use of a chloroform extraction phase. *J Biochem Biophys Methods.* 2004; 60: 171-177.
- Bracey MH, Hanson MA, Masuda KR, Stevens RC, Cravatt BF. Structural adaptations in a membrane enzyme that terminates endocannabinoid signaling. *Science* 2002. 298: 1793-1796.
- Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* 1996. 384: 83-87.
- Cravatt BF, Saghatelian A, Hawkins EG, Clement AB, Bracey MH, Lichtman AH. Functional disassociation of the central and peripheral fatty acid amide signaling systems. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004. 101: 10821-10826.
- De Bank PA, Kendall DA, Alexander SP. A spectrophotometric assay for fatty acid amide hydrolase suitable for high-throughput screening. *Biochem Pharmacol.* 2005. 69: 1187-1193.
- Deutsch DG, Chin SA. Enzymatic synthesis and degradation of anandamide, a cannabinoid receptor agonist. *Biochem Pharmacol.* 1993. 46: 791-796.
- Ghil S, Choi JM, Kim SS, Lee YD, Liao Y, Birnbaumer L, Suh-Kim H. Compartmentalization of protein kinase A signaling by the heterotrimeric G protein Go. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006. 103: 19158-19163.
- Hohmann AG, Suplita RL. Endocannabinoid mechanisms of pain modulation. *AAPS J.* 2006. 8: E693-708.
- Jayamanne A, Greenwood R, Mitchell VA, Aslan S, Piomelli D, Vaughan CW. Actions of the FAAH inhibitor URB597 in neuropathic and inflammatory chronic pain models. *Br J Pharmacol.* 2006. 147: 281-288.
- Labar G, Michaux C. Fatty acid amide hydrolase: from characterization to therapeutics. *Chem Biodivers.* 2007. 4: 1882-1902.
- Maccarrone M, Bari M, Agrò AF. A sensitive and specific radiochromatographic assay of fatty acid amide hydrolase activity. *Anal Biochem.* 1999. 267: 314-318.
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 1990. 346: 561-564.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 1993. 365: 61-65.
- Omeir RL, Chin S, Hong Y, Ahern DG, Deutsch DG. Arachidonoyl ethanolamide-[1,2-14C] as a substrate for anandamide amidase. *Life Sci.* 1995. 56: 1999-2005.
- Patricelli MP, Cravatt BF. Characterization and manipulation of the acyl chain selectivity of fatty acid amide hydrolase. *Biochemistry* 2001. 40: 6107-6115.
- Ramarao MK, Murphy EA, Shen MW, Wang Y, Bushell KN,

- Huang N, Pan N, Williams C, Clark JD. A fluorescence-based assay for fatty acid amide hydrolase compatible with high-throughput screening. *Anal Biochem.* 2005. 343: 143-151.
- Timmons A, Seierstad M, Apodaca R, Epperson M, Pippel D, Brown S, Chang L, Scott B, Webb M, Chaplan SR, Breitenbucher JG. Novel ketoazole based inhibitors of fatty acid amide hydrolase (FAAH). *Bioorg Med Chem Lett.* 2008. 18: 2109-2113.
- Ueda N, Puffenberger RA, Yamamoto S, Deutsch DG. The fatty acid amide hydrolase (FAAH). *Chem Phys Lipids.* 2000. 108: 107-121.
- Wilson SJ, Lovenberg TW, Barbier AJ. A high-throughput-compatible assay for determining the activity of fatty acid amide hydrolase. *Anal Biochem.* 2003. 318: 270-275.
- Zhang D, Saraf A, Kolasa T, Bhatia P, Zheng GZ, Patel M, Lannoye GS, Richardson P, Stewart A, Rogers JC, Brioni JD, Surowy CS. Fatty acid amide hydrolase inhibitors display broad selectivity and inhibit multiple carboxylesterases as off-targets. *Neuropharmacology* 2007. 52: 1095-1105.
-