



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Illuminating N-acylethanolamine biosynthesis with new chemical tools**

Mock, E.D.

### **Citation**

Mock, E. D. (2019, November 6). *Illuminating N-acylethanolamine biosynthesis with new chemical tools*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/80154>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/80154>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

## Samenvatting

### Nieuw moleculair gereedschap voor het bestuderen van de biosynthese van *N*-acylethanolamines

Dit proefschrift beschrijft de ontdekking en optimalisatie van moleculair gereedschap om de biosynthese van *N*-acylethanolamines (NAEs) beter in kaart te brengen. Twee relevante enzymen zijn hiervoor bestudeerd, te weten *N*-acylfosfatidylethanolamine fosfolipase D (NAPE-PLD) en fosfolipase A en acyltransferase 2 (PLAAT2), respectievelijk betrokken bij de productie van NAEs of hun directe precursors, de NAPEs. Om nieuwe remmers te identificeren, zogeheten *hits*, zijn verschillende screeningsmethodes toegepast zoals *high-throughput screening* (HTS) en screenings van specifieke molecuulbibliotheken. Door middel van structuur-activiteitrelaties zijn deze initiële *hits* geoptimaliseerd tot potente enzymremmers, die werkzaam zijn in cellulaire en/of diermodellen. Het vaststellen van remmer-enzym interactie, ook wel *target engagement* genoemd, is bevestigd met fotoaffiniteitlabeling (PAL) of activiteit-gebaseerde eiwit profilering (ABPP). Verder is met behulp van *lipidomics* cellulaire en/of *in vivo* activiteit aangetoond van de beschreven remmers. Tot slot liet de hier beschreven NAPE-PLD remmer **LEI-401** pijnstillende effecten zien in meerdere muismodellen, dat mogelijk van therapeutische waarde is en verder zal worden bestudeerd in toekomstig onderzoek.

**Hoofdstuk 1** geeft een overzicht van de aanmaak en afbraak van NAEs en hun biologische functies. De NAEs zijn een familie van signaallipiden waartoe onder andere *N*-palmitoylethanolamine (PEA), *N*-oleoylethanolamine (OEA), *N*-arachidonoylethanolamine (AEA, anandamide) en *N*-docosahexaenoylethanolamine (DHEA) behoren. De verschillende NAEs activeren specifieke receptoren zowel in het brein als in de periferie, zoals G-eiwit gekoppelde receptoren (GPCRs), ionkanalen en kernreceptoren. Het meest bekende voorbeeld is anandamide, in 1992 ontdekt als endogene agonist van de cannabis CB<sub>1</sub> receptor en om deze reden gemunt als endocannabinoïde.<sup>1</sup> Vervolgonderzoek liet zien dat anandamide ook de CB<sub>2</sub> receptor en de *transient receptor potential receptor 1* (TRPV1, capsaïcine receptor) kan activeren. Om deze reden wordt anandamide ook tot de endovanilloïden gerekend.<sup>2</sup> Een scala aan biologische functies zijn aan anandamide gekoppeld, zoals pijnstilling<sup>3</sup>, stimulering van de

eetlust<sup>4</sup>, de regulatie van vruchtbaarheid<sup>5</sup>, neurobescherming<sup>6</sup>, geheugenconsolidatie en extinctie<sup>7</sup>, evenals antidepressieve<sup>8</sup> en angstreducerende<sup>9</sup> werkingen.

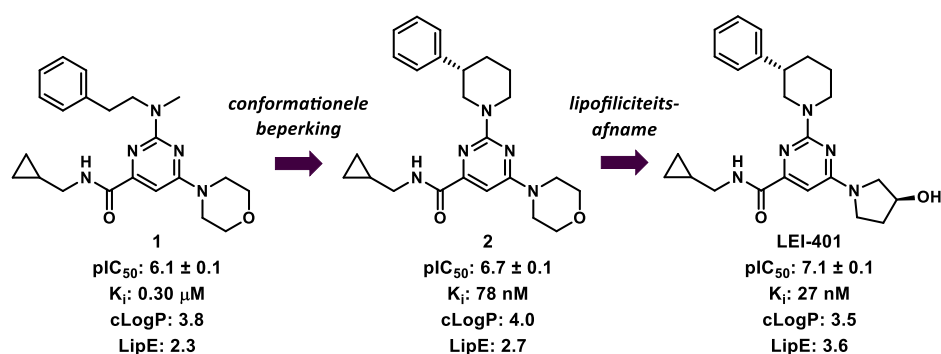
Tevens wordt in **Hoofdstuk 1** behandeld wat de therapeutische mogelijkheden zijn van het aanpassen van endogene NAE-niveaus, inclusief anandamide, met bijzondere aandacht voor het *verlagen* van NAEs. Bij meerdere ziektes zijn NAEs en hun metabole enzymen verstoord. Deze verstoringen zijn gerelateerd aan de ernst van het ziektebeeld, onder andere bij obesitas<sup>10</sup>, metabool syndroom<sup>11</sup>, lever-<sup>12</sup> en bloedkanker<sup>13</sup> en levercirrose<sup>14</sup>. Klinisch en preklinisch onderzoek heeft aangetoond dat farmacologische remming van de CB<sub>1</sub> receptor of andere NAE-receptoren effectief kan zijn bij de behandeling van deze aandoeningen. Helaas bleek dat de inhibitie van de CB<sub>1</sub> receptor in de hersenen ernstige psychologische bijeffecten kan geven en om die reden is het obesitasmedicijn rimonabant van de markt gehaald. Momenteel wordt remming van de CB<sub>1</sub> receptor enkel in de periferie onderzocht als nieuwe therapeutische strategie.<sup>15</sup> Inhibitie van de biosynthetische enzymen van NAEs kan een geschikt alternatief zijn om deze ziektes te behandelen. Een bijkomend voordeel hiervan is partiële remming van de desbetreffende receptor, aangezien de NAE-receptoren ook andere endogene liganden hebben die hun signaalfunctie blijven vervullen. Dit kan leiden tot een betere afstemming van het gewenste effect en vergroting van de therapeutische breedte. Tot dusver zijn er geen farmacologische middelen om NAE-niveaus te verlagen in cel- of diermodellen waardoor dit onderzoek nog in de kinderschoenen staat. Nieuwe remmers voor de biosynthetische enzymen van NAEs zijn dus nodig om de signaleringsfuncties van NAEs te kunnen bestuderen in modellen van ziekte en gezondheid.

## Ontwikkeling van *in vivo* actieve NAPE-PLD remmers

De afbraak van anandamide door het enzym vetzuuramide hydrolase (FAAH) is uitvoerig onderzocht met behulp van genetische en farmacologische modellen. Daarentegen is het tot op heden onduidelijk hoe de biosynthese van anandamide is gereguleerd.<sup>16</sup> NAPE-PLD, een zink hydrolase, wordt beschouwd als het enzym dat hoofdverantwoordelijk is voor de productie van NAEs waaronder anandamide. Verschillende NAPE-PLD *knockout* muismodellen lieten echter een spreiding zien in de mate van anandamideverlaging in de hersenen, met slechts een significant resultaat in twee van drie uitgekomen studies.<sup>17-19</sup> Als verklaring zijn compensatiemechanismen voorgesteld die gedurende de ontwikkeling kunnen optreden.<sup>17</sup> Bovendien zijn alternatieve biosyntheseroutes van NAEs ontdekt die mogelijk kunnen compenseren voor het gemis van NAPE-PLD.<sup>16</sup> Om anandamide beter te bestuderen zijn daarom farmacologische gereedschappen noodzakelijk waarmee de

biosynthese van anandamide acuut kan worden geblokkeerd. Tot nu toe zijn voor NAPE-PLD dergelijke gereedschappen niet beschikbaar.

In **Hoofdstuk 2** is gestart met de zoektocht naar nieuwe chemotypes die NAPE-PLD kunnen remmen door middel van *high-throughput screening* (HTS). Hiervoor is een op fluorescentie gebaseerde NAPE-PLD activiteits-*assay* gebruikt, die geoptimaliseerd is om een dergelijke HTS uit te kunnen voeren. In deze *assay* wordt het substraat PED6 gebruikt, dat door NAPE-PLD kan worden gehydrolyseerd zodat een fluorofoor vrijkomt. De toename in fluorescentie kan worden gemeten en is proportioneel met de enzymatische activiteit van NAPE-PLD. De HTS-campagne startte met het screenen van een bibliotheek van ~350,000 stoffen bij een concentratie van 10  $\mu\text{M}$ . Nadat de initiële *hits* waren bevestigd, zijn er dosis-respons experimenten en twee deselectie-*assays* uitgevoerd, waarbij is gefilterd op zink chelatoren en fluorescentie *quenchers* (uitdoovers). Dit resulteerde in vijf *hit*moleculen. Uit deze verbindingen is pyrimidine-4-carboxamide **1** (Figuur 1) gekozen om te worden hergesynthetiseerd, vanwege zijn gunstige potentie, goede fysicochemische eigenschappen, en relatief eenvoudige synthese. Stof **1** kon worden bevestigd als NAPE-PLD remmer met submicromolaire activiteit. Verder was **1**, wat betreft het endocannabinoïde systeem (ECS), selectief voor NAPE-PLD *in vitro*, aangezien geen *off-target* activiteit voor deze receptoren en enzymen werd gevonden. Verbinding **1** kan dus als nieuw beginpunt worden beschouwd om *in vivo* actieve NAPE-PLD remmers te ontwikkelen.



**Figuur 1.** De gebruikte strategie om *hit* verbinding **1** te optimaliseren naar NAPE-PLD remmer **LEI-401** met verbetering van potentie en lipofiliciteit. cLogP is berekend met Chemdraw 15. Lipofiele efficiëntie (LipE) =  $\text{pIC}_{50} - \text{cLogP}$ .

De optimalisatie van stof **1** is beschreven in **Hoofdstuk 3**. Hierin wordt een studie naar de structuur-activiteitsrelatie van **1** behandeld om de potentie en lipofiliciteit te

verbeteren. Verbinding **LEI-401** is geïdentificeerd nadat 104 analogen van **1** waren gesynthetiseerd. Deze optimale verbinding remt NAPE-PLD bij nanomolaire concentraties. Conformationele beperking van de *N*-methylfenethylamine van **1** naar een (*S*)-3-fenylpiperidine zorgde voor een viervoudige toename van de activiteit (verbinding **2**, Figuur 1). De vervanging van de morfoline van **1** met een (*S*)-3-hydroxypyrrolidine (**LEI-401**) verhoogde de potentie verder en verminderde tegelijk de lipofiliciteit. **LEI-401** bezit gunstige fysicochemische eigenschappen zoals een redelijke lipofiele efficiëntie (LipE) en laag topologisch polair oppervlak (tPSA) en is hierdoor geschikt om cellulaire en *in vivo* studies uit te voeren.

In **Hoofdstuk 4** is onderzocht of **LEI-401** een bindingsinteractie aangaat met NAPE-PLD in levende cellen, het zogeheten *target engagement*. Hiervoor is een strategie gekozen op basis van fotoaffiniteitlabeling (PAL), dat een veelgebruikte techniek is om eiwit-molecuul interacties aan te tonen, bijvoorbeeld bij metallohydrolases.<sup>20</sup> Bij PAL bindt een fotoaffiniteitprobe covalent aan het desbetreffende eiwit nadat deze is beschenen met uv-licht. Vervolgens kan met behulp van gel of *chemical proteomics* methodes het eiwit worden gevisualiseerd en geïdentificeerd. Met een remmer kan in een competitie-experiment de probe-eiwit labeling worden verdrongen, dat het bewijs levert van *target engagement*. Twee ontwerpen van fotoaffiniteitprobes zijn uitgewerkt. Het eerste ontwerp bestond uit *mimics* van het endogene substraat van NAPE-PLD, de NAPes. Bij deze verbindingen werd een diazine *photocrosslinker*, een gestabiliseerde fosfordiester bioisosteer en een alkyn 'haakje' voor klikchemie ingebouwd. Deze moleculen hadden lage affiniteit voor NAPE-PLD in de *in vitro* activiteits-assay en konden NAPE-PLD niet visualiseren in humane embryonale niercellen (HEK293T) waarin dit eiwit tot overexpressie was gebracht. Een tweede ontwerp ging uit van de bibliotheek van NAPE-PLD remmers beschreven in Hoofdstuk 3, om hiermee een fotoaffiniteitprobe te maken met een pyrimidine-4-carboxamide *scaffold*. Probe **3** had een submicromolaire potentie voor NAPE-PLD en liet efficiënte labeling van dit eiwit zien in getransfecteerde HEK293T cellen. Door middel van competitie-experimenten op gel en via *chemical proteomics* kon *target engagement* van **LEI-401** met NAPE-PLD worden vastgesteld in levende cellen.

**Hoofdstuk 5** beschrijft de verdere profilering van **LEI-401** in cel- en diermodellen. Eerst werd de selectiviteit van **LEI-401** bepaald voor de receptoren en enzymen van het ECS, waaruit bleek dat **LEI-401** een selectieve NAPE-PLD remmer is. Lipidenmetingen in neuronale cellen van muizen toonden aan dat **LEI-401** NAE-niveaus kan verlagen in wildtype cellen, maar niet in NAPE-PLD *knockout* cellen. Vanwege dit positieve resultaat is **LEI-401** getest in C57BL/6J muizen. Hieruit bleek dat deze stof een gunstig farmacokinetisch (PK) profiel bezit. Twee uur na toediening van een enkele

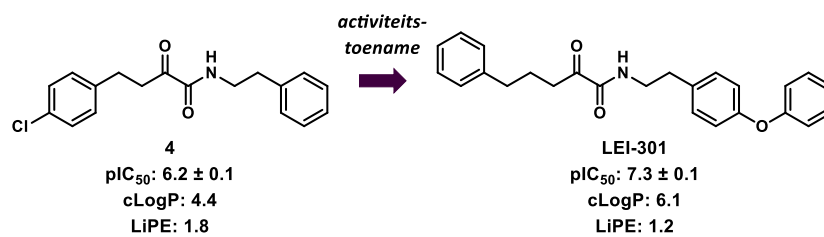
intraperitoneale dosis (30 mg/kg) werden hoge niveaus van **LEI-401** gemeten in het bloedplasma en de hersenen. Bovendien werd een tijd- en dosisafhankelijke verlaging van anandamide gemeten, in overeenstemming met het PK-profiel. Dit duidt er op dat **LEI-401** een *in vivo* actieve NAPE-PLD remmer is die de bloed-hersenbarrière gemakkelijk passeert. Daarnaast onderstreept het de rol van NAPE-PLD bij de biosynthese van anandamide in de hersenen. Om de farmacologische effecten van acute anandamideverlaging in de hersenen te bepalen, werd **LEI-401** getest in verschillende gedragsassays. Hieruit bleek dat **LEI-401** een pijnverlagende werking heeft in C57BL/6J muizen. Hiernaast zorgt **LEI-401** ook voor vermindering van beweging en verlaging van de lichaamstemperatuur. Deze effecten waren niet gemedieerd door de CB<sub>1</sub> receptor. Tot slot werd in een muismodel van inflammatoire pijn vastgesteld dat **LEI-401** allodynie, opgewekt door lipopolysaccharide (LPS), volledig kan omkeren. Tezamen tonen deze experimenten aan dat **LEI-401** analgetische eigenschappen bezit die van therapeutisch nut kunnen zijn. Vervolgstudies zijn noodzakelijk waarbij **LEI-401** wordt toegediend aan NAPE-PLD *knockout* muizen om vast te stellen of deze gedragseffecten afhankelijk zijn van NAPE-PLD.

### **Ontwikkeling van remmers van de calcium-onafhankelijke NAPE-biosynthese**

De productie van NAPes door een *N*-acyltransferase (NAT) activiteit wordt algemeen beschouwd als de snelheidsbepalende stap van de NAE-biosynthese.<sup>21,22</sup> In de afgelopen jaren zijn, naast de canonieke Ca<sup>2+</sup>-afhankelijke route voor de vorming van NAPes, ook nieuwe calcium-onafhankelijke enzymen ontdekt.<sup>16</sup> Met name het eiwit PLAAT2 heeft *in vitro* hoge *N*-acyltransferase activiteit volgens eerdere studies.<sup>23</sup> Tot op heden zijn er geen farmacologische gereedschappen beschikbaar om PLAAT2-activiteit in cellen te moduleren. In **Hoofdstuk 6** is gebruik gemaakt van een recent beschreven ABPP-*assay*<sup>24</sup> om een kleine bibliotheek van lipaseremmers te testen op inhibitie van PLAAT2. Verbinding **4** is hierbij geïdentificeerd als de meeste potente stof van een serie  $\alpha$ -ketoamide remmers (Figuur 2).

Analyse van de structuur-activiteitrelatie van het  $\alpha$ -ketoamide *scaffold* resulteerde in de geoptimaliseerde remmer **LEI-301**, waarmee een dertienvoudige toename in potentie was bereikt vergeleken met stof **4**. **LEI-301** toonde vergelijkbare activiteit voor de andere eiwitten in de PLAAT familie, maar remde de receptoren en overige enzymen van het ECS niet. Vervolgens zijn lipidenmetingen uitgevoerd met humane osteosarcoma (U2OS) cellen getransfecteerd met PLAAT2. Dit zorgde voor een zeer grote toename van de

NAE-niveaus. Behandeling met **LEI-301** gaf een significante verlaging van de meeste NAEs, specifiek in de PLAAT2 overexpressiecellen maar niet in de controlecellen. Hiermee is aangetoond dat **LEI-301** cellulair PLAAT2 kan remmen en dat PLAAT2 zelf een belangrijke bijdrage kan leveren aan de biosynthese van NAEs. Daarbij zijn de  $\alpha$ -ketoamides een nieuwe klasse van remmers die, in celmodellen, verder onderzoek mogelijk maken naar de signaalfuncties van NAEs en NAEs.



**Figuur 2.** Moleculaire structuren en fysicochemische parameters van  $\alpha$ -ketoamide **4** en geoptimaliseerde PLAAT2 remmer **LEI-301**. cLogP is berekend met Chemdraw 15. Lipofiele efficiëntie (LipE) =  $pIC_{50}$  - cLogP.

## Slotwoord

Selectieve en *in vivo* actieve remmers zijn essentiële benodigdheden voor het ophelderen van biologische signaleringsnetwerken en de ontwikkeling van nieuwe medicijnen. In dit proefschrift worden nieuwe remmers (**LEI-301** en **LEI-401**), fotoaffiniteitprobes en assays beschreven om de enzymen NAPE-PLD en PLAAT2 te bestuderen, die beide betrokken zijn bij de productie van NAEs. Tot nu toe hebben genetische *knockout*-modellen niet volledig de complexiteit van de NAE-biosynthese kunnen verduidelijken, mogelijk door compensatie-effecten die kunnen optreden op de lange termijn. Acute blokkade van deze enzymen met de hierin beschreven farmacologische remmers kan de bijdrage van NAPE-PLD en PLAAT2 aan de vorming van NAEs beter in kaart brengen in specifieke cellen en weefsels. Daarnaast zijn **LEI-301** en **LEI-401** geschikte gereedschappen om de biologische consequenties van NAE-verlaging te onderzoeken. Deze verlaging zou mogelijk een behandeling kunnen opleveren voor aandoeningen als obesitas, metabool syndroom, chronische leverziekte en kanker.

## Referenties

1. Devane, W., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R., Stevenson, L., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A. & Mechoulam, R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* **258**, 1946-1949 (1992).
2. Stelt, M.v.d. & Marzo, V.D. Endovanilloids. *European Journal of Biochemistry* **271**, 1827-1834 (2004).
3. Cravatt, B.F., Demarest, K., Patricelli, M.P., Bracey, M.H., Giang, D.K., Martin, B.R. & Lichtman, A.H. Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 9371-9376 (2001).
4. Williams, C.M. & Kirkham, T.C. Anandamide induces overeating: mediation by central cannabinoid (CB<sub>1</sub>) receptors. *Psychopharmacology* **143**, 315-317 (1999).
5. Wang, H., Xie, H., Guo, Y., Zhang, H., Takahashi, T., Kingsley, P.J., Marnett, L.J., Das, S.K., Cravatt, B.F. & Dey, S.K. Fatty acid amide hydrolase deficiency limits early pregnancy events. *The Journal of Clinical Investigation* **116**, 2122-2131 (2006).
6. Eljaschewitsch, E., Witting, A., Mawrin, C., Lee, T., Schmidt, P.M., Wolf, S., Hoertnagl, H., Raine, C.S., Schneider-Stock, R., Nitsch, R. & Ullrich, O. The endocannabinoid anandamide protects neurons during CNS inflammation by induction of MKP-1 in microglial cells. *Neuron* **49**, 67-79 (2006).
7. Morena, M., Roozendaal, B., Trezza, V., Ratano, P., Peloso, A., Hauer, D., Atsak, P., Trabace, L., Cuomo, V., McGaugh, J.L., Schelling, G. & Campolongo, P. Endogenous cannabinoid release within prefrontal- limbic pathways affects memory consolidation of emotional training. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 18333-18338 (2014).
8. Gobbi, G., Bambico, F.R., Mangieri, R., Bortolato, M., Campolongo, P., Solinas, M., Cassano, T., Morgese, M.G., Debonnel, G., Duranti, A., Tontini, A., Tarzia, G., Mor, M., Trezza, V., Goldberg, S.R., Cuomo, V. & Piomelli, D. Antidepressant-like activity and modulation of brain monoaminergic transmission by blockade of anandamide hydrolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 18620-18625 (2005).
9. Kathuria, S., Gaetani, S., Fegley, D., Valiño, F., Duranti, A., Tontini, A., Mor, M., Tarzia, G., Rana, G.L., Calignano, A., Giustino, A., Tattoli, M., Palmery, M., Cuomo, V. & Piomelli, D. Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nature Medicine* **9**, 76 (2002).
10. Fanelli, F., Mezzullo, M., Repaci, A., Belluomo, I., Ibarra Gasparini, D., Di Dalmazi, G., Mastroberto, M., Vicennati, V., Gambineri, A., Morselli-Labate, A.M., Pasquali, R. & Pagotto, U. Profiling plasma *N*-acylethanolamine levels and their ratios as a biomarker of obesity and dysmetabolism. *Molecular Metabolism* **14**, 82-94 (2018).
11. Bowles, N.P., Karatsoreos, I.N., Li, X., Vemuri, V.K., Wood, J.-A., Li, Z., Tamashiro, K.L.K., Schwartz, G.J., Makriyannis, A.M., Kunos, G., Hillard, C.J., McEwen, B.S. & Hill, M.N. A peripheral endocannabinoid mechanism contributes to glucocorticoid-mediated metabolic syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**, 285-290 (2015).
12. Mukhopadhyay, B., Schuebel, K., Mukhopadhyay, P., Cinar, R., Godlewski, G., Xiong, K., Mackie, K., Lizak, M., Yuan, Q., Goldman, D. & Kunos, G. Cannabinoid receptor 1 promotes hepatocellular carcinoma initiation and progression through multiple mechanisms. *Hepatology* **61**, 1615-1626 (2015).
13. Masoodi, M., Lee, E., Eiden, M., Bahlo, A., Shi, Y., Ceddia, R.B., Baccei, C., Prasit, P. & Spaner, D.E. A role for oleoylethanolamide in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* **28**, 1381 (2014).
14. Caraceni, P., Viola, A., Piscitelli, F., Giannone, F., Berzigotti, A., Cescon, M., Domenicali, M., Petrosino, S., Giampalma, E., Riili, A., Grazi, G., Golfieri, R., Zoli, M., Bernardi, M. & Di Marzo, V. Circulating and hepatic endocannabinoids and endocannabinoid-related molecules in patients with cirrhosis. *Liver International* **30**, 816-825 (2010).
15. Tam, J., Hinden, L., Drori, A., Udi, S., Azar, S. & Baraghithy, S. The therapeutic potential of targeting the peripheral endocannabinoid/CB<sub>1</sub> receptor system. *European Journal of Internal Medicine* **49**, 23-29 (2018).



16. Hussain, Z., Uyama, T., Tsuboi, K. & Ueda, N. Mammalian enzymes responsible for the biosynthesis of *N*-acylethanolamines. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1862**, 1546-1561 (2017).
17. Leung, D., Saghatelian, A., Simon, G.M. & Cravatt, B.F. Inactivation of *N*-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D reveals multiple mechanisms for the biosynthesis of endocannabinoids. *Biochemistry* **45**, 4720-4726 (2006).
18. Tsuboi, K., Okamoto, Y., Ikematsu, N., Inoue, M., Shimizu, Y., Uyama, T., Wang, J., Deutsch, D.G., Burns, M.P., Ulloa, N.M., Tokumura, A. & Ueda, N. Enzymatic formation of *N*-acylethanolamines from *N*-acylethanolamine plasmalogen through *N*-acylphosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D-dependent and -independent pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1811**, 565-577 (2011).
19. Leishman, E., Mackie, K., Luquet, S. & Bradshaw, H.B. Lipidomics profile of a NAPE-PLD KO mouse provides evidence of a broader role of this enzyme in lipid metabolism in the brain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1861**, 491-500 (2016).
20. Lapinsky, D.J. & Johnson, D.S. Recent developments and applications of clickable photoprobes in medicinal chemistry and chemical biology. *Future Medicinal Chemistry* **7**, 2143-2171 (2015).
21. van der Stelt, M., Hansen, H.H., Veldhuis, W.B., Bär, P.R., Nicolay, K., Veldink, G.A., Vliegthart, J.F.G. & Hansen, H.S. Biosynthesis of endocannabinoids and their modes of action in neurodegenerative diseases. *Neurotoxicity Research* **5**, 183-199 (2003).
22. Wang, J. & Ueda, N. Biology of endocannabinoid synthesis system. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* **89**, 112-119 (2009).
23. Uyama, T., Ikematsu, N., Inoue, M., Shinohara, N., Jin, X.-H., Tsuboi, K., Tonai, T., Tokumura, A. & Ueda, N. Generation of *N*-acylphosphatidylethanolamine by members of the phospholipase A/acyltransferase (PLA/AT) family. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 31905-31919 (2012).
24. Zhou, J., Mock, E.D., Martella, A., Kantae, V., Di, X., Burggraaff, L., Baggelaar, M.P., Al-Ayed, K., Bakker, A., Florea, B.I., Grimm, S.H., den Dulk, H., Li, C.T., Mulder, L., Overkleeft, H.S., Hankemeier, T., van Westen, G.J.P. & van der Stelt, M. Activity-based protein profiling identifies  $\alpha$ -ketoamides as inhibitors for phospholipase A<sub>2</sub> group XVI. *ACS Chemical Biology* **14**, 164-169 (2019).