

Enzymatische Halogenierung von Tryptophan im Gramm-Maßstab**

Marcel Frese und Norbert Sewald*

Abstract: Halogenierte Arene stellen wichtige Bausteine in Medizinalchemie und Agrochemie dar. Chemische elektrophile aromatische Halogenierungen verwenden elementare Halogene, während FAD-abhängige Halogenasen lediglich Halogenidsalze und O_2 bei Raumtemperatur in wässrigem Milieu für die regioselektive Halogenierung benötigen. Enzymatische Halogenierungen galten als ineffizient aufgrund der mangelnden Stabilität der Halogenasen, was die präparative Anwendung limitierte. Wir konnten zeigen, dass die Langzeitstabilität und damit die Effizienz der Tryptophan-7-Halogenase RebH signifikant durch die simultane Immobilisierung von RebH und allen Hilfsenzymen zur Cofaktorregenerierung erhöht werden kann. Durch die Verwendung von RebH-combiCLEAs als multifunktionaler wiederverwendbarer Biokatalysator haben wir eine einfache Methode zur Halogenierung von Tryptophan und dessen Derivaten im Gramm-Maßstab entwickelt, die vermutlich ebenso für andere FAD-abhängige Halogenasen anwendbar ist.

Obwohl Halogenierungen gängige Reaktionen in der organischen Chemie darstellen, bleiben regioselektive Methoden zur Einführung von Halogensubstituenten an mechanistisch ungünstigen Positionen eine herausfordernde Aufgabe. Aufgrund etablierter Techniken der Modifizierung durch nukleophile Substitution oder Übergangsmetallkatalysierte Kreuzkupplungen bilden Arylhalogenide wichtige Zwischenstufen in der chemischen, agrochemischen und pharmazeutischen Industrie.^[1] Der chemische Einbau von Halogensubstituenten ist angesichts der Verwendung gefährlicher Chemikalien wie elementarem Chlor oder Brom, oft in Kombination mit Lewis-Säuren, ein umweltbelastender Prozess. Häufig entstehen Nebenprodukte aufgrund nicht eindeutiger Regioselektivitäten. In der Natur haben sich enzymatische Strategien zur Bildung halogenierter Metabolite entwickelt, die unter deutlich milderen Bedingungen bei 25 °C und pH 7 ablaufen und dabei lediglich ungefährliche Halogenidsalze und Sauerstoff benötigen. FAD-abhängige Halogenasen bilden die wichtigste Enzymklasse für regioselektive Halogenierungen ohne Bindung des Substrates an ein Trägerprotein. Repräsentanten dieser Enzymklasse sind die

Tryptophan-7-Halogenase PrnA^[2] und ihr naher Verwandter RebH aus dem Bakterium *Lechevalieria aerocolonigenes*.^[3] Beide Halogenasen chlorieren L-Tryptophan regioselektiv an der elektronisch ungünstigen C7-Position des Indolrings. Eine zusätzliche Flavin-Reduktase liefert $FADH_2$, das in der aktiven Tasche der Halogenase durch molekularen Sauerstoff oxidiert wird und ein Flavinhydroperoxid bildet. Dieses wird anschließend nukleophil von einem Halogenidion angegriffen. Die dabei entstehende hypohalogenige Säure wird von der FAD- zur Tryptophanbindestelle durch einen 10 Å langen Tunnel geleitet.^[4–7] Aufgrund der Sandwich-artigen Bindung von L-Tryptophan im Inneren der aktiven Tasche der Halogenase wird selektiv die C7-Position für eine Chlorierung oder Bromierung zugänglich.^[7,8] Der konservierte Lysinrest K79 wird dabei selektiv durch die hypohalogenige Säure oxidiert, wodurch die eigentliche halogenierende Spezies, ein langlebiges N-Halogenamin, gebildet wird.^[9] Neben der Tryptophan-7-Halogenase RebH sind ebenso C5-^[10] und C6-Tryptophan-Halogenasen^[11] in der Literatur beschrieben.

Enzym-katalysierte Reaktionen sind seit langem bekannt für ihre hohe Stereo- und Regioselektivität.^[12,13] Aufgrund dieser Vorteile entwickelte sich die Biokatalyse zu einem aufstrebenden Gebiet innerhalb der Biotechnologie, insbesondere im Hinblick auf grüne und nachhaltige Chemie. Durch die hohe Selektivität enzymatischer Reaktionen kann in vielen Fällen auf die Verwendung von Schutzgruppen oder aktivierender Gruppen verzichtet werden, was häufig zu kürzeren und effizienteren Syntheserouten führt. Allerdings zeigen viele Enzyme, beispielsweise Halogenasen, eine geringe Stabilität und Aktivität unter nichtnatürlichen Reaktionsbedingungen in Gegenwart hoher Substratkonzentrationen.

Enzymimmobilisierung hat sich dabei als erfolgreiche Methode erwiesen, diese Stabilitätsprobleme zu umgehen^[14] und gleichzeitig die einfache Abtrennung und Wiederverwertung des Biokatalysators zu ermöglichen. Obwohl in der Vergangenheit eine Vielzahl verschiedenster Immobilisierungsstrategien entwickelt wurde, haben sich insbesondere vernetzte Enzymaggregate („cross-linked enzyme aggregates“, CLEAs) als trägerfreie Katalysatoren mit herausragenden Vorteilen etabliert, die unter anderem durch ihre Einfachheit brillieren. Das Enzym der Wahl wird dabei durch Zugabe von Ammoniumsulfat oder Polyethylenglykol präzipitiert, gefolgt von einer Vernetzung von Lysinresten an der Enzymoberfläche mittels bifunktionaler Moleküle wie Glutaraldehyd. Ein entscheidender Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit, Aufreinigung und Immobilisierung der Enzyme in einem Schritt zu kombinieren, sodass diese Technik auch für Proteinrohextrakte anwendbar ist.

In einer Reihe von Studien wurden für Halogenasen ungünstige kinetische Eigenschaften mit einer Wechselzahl $k_{cat} \approx 1.0 \text{ min}^{-1}$ und einer katalytischen Produktivität („total

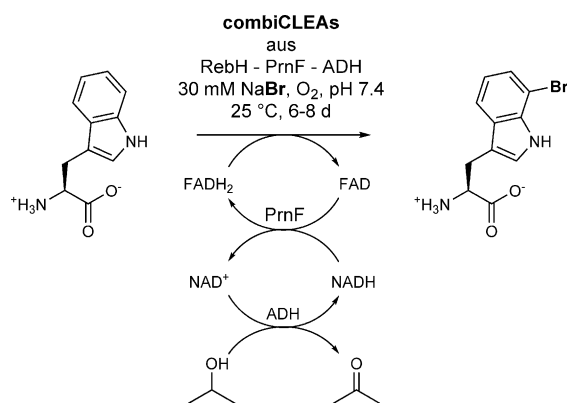
[*] M. Frese, Prof. Dr. N. Sewald
Fakultät für Chemie, Organische und Bioorganische Chemie
Universität Bielefeld
Universitätsstraße 25, 33615 Bielefeld (Deutschland)
E-Mail: norbert.sewald@uni-bielefeld.de
Homepage: <http://www.uni-bielefeld.de/chemie/oc3sewald/>

[**] Wir bedanken uns bei Prof. Dr. Karl-Heinz van Pée und bei Prof. Dr. Werner Hummel für die Bereitstellung der für die Flavin-Reduktase PrnF sowie für die Alkoholdehydrogenase-kodierenden Plasmide.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201408561> zu finden.

turnover number“, TTN) unter 200 bestimmt, wodurch die praktische synthetische Anwendung von Halogenasen bislang unmöglich erschien.^[2,3,6,9,11,15–17] Bisher wurde hauptsächlich das Substratspektrum von Halogenasen im analytischen Maßstab untersucht,^[18] während bei der präparativen enzymatischen Halogenierung noch deutlicher Optimierungsbedarf besteht. Payne et al. verwendeten kürzlich *E. coli*-Lysat einer RebH-Überexpression aus mehr als 10 L Kultivierungsvolumen zur Synthese von weniger als 90 mg chloriertem Tryptophan in moderaten Ausbeuten.^[15] Die großen Mengen an Verunreinigungen im *E. coli*-Lysat nach RebH-Überexpression erschweren zusätzlich die anschließende Aufreinigung des halogenierten Produkts. Besonders verbleibende Chloridionen aus dem Kultivierungsmedium beeinträchtigen enzymatische Bromierungen.

Unser Projekt ist auf die Entwicklung einer einfachen enzymatischen Halogenierungsmethode fokussiert, die ohne Verwendung großer Kultivierungsvolumina auch im Multi-gramm-Maßstab anwendbar ist. Unsere Idee war, die L-Tryptophan-7-Halogenase RebH mit allen benötigten Hilfsenzymen für die Cofaktorregenerierung mittels gemeinsamer Präzipitation und Vernetzung zu immobilisieren, um einen festen wiederverwendbaren Biokatalysator als multifunktionelle CLEAs (combiCLEAs) zu erhalten (Schema 1). Der



Schema 1. Die Vernetzung von präzipitierter Tryptophan-7-Halogenase RebH, Flavin-Reduktase PrnF und einer Alkoholdehydrogenase aus *Rhodococcus* sp. liefert wiederverwendbare multifunktionelle vernetzte Enzymaggregate („cross-linked enzyme aggregates“, CLEAs), welche die regioselektive Halogenierung von Tryptophan im Gramm-Maßstab katalysieren.

Katalysator sollte sich dabei durch Filtration für die erneute Verwendung entfernen lassen. *E. coli*-Lysat von 1.5 L Kulturmedium einer RebH-Überexpression wurde dafür ohne weitere Aufarbeitung mit den benötigten Hilfsenzymen für die kontinuierliche Cofaktorregenerierung, der Flavin-Reduktase PrnF und einer Alkoholdehydrogenase aus *Rhodococcus* sp. versehen. Nach der Ammoniumsulfatfällung der drei Enzyme wurde Glutaraldehyd in verschiedenen Mengen zugegeben, um die ideale Konzentration des Vernetzers zu ermitteln. Bei Verwendung geringer Glutaraldehydkonzentrationen zeigten die gebildeten RebH-combiCLEAs die höchste Konversion (Abbildung 1 A). Da der vorgeschlagene enzymatische Mechanismus von RebH ein N-Halogenamin

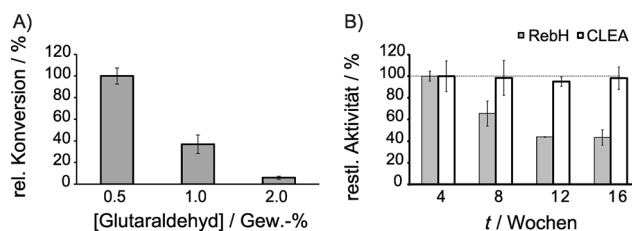


Abbildung 1. A) Einfluss verschiedener Glutaraldehydkonzentrationen zur Vernetzung der präzipitierten Enzyme RebH, PrnF und ADH auf die katalytische Aktivität. Die höchste Konversion von L-Tryptophan konnte mit einer relativ geringen Vernetzerkonzentration von 0.5% erreicht werden. Da Glutaraldehyd Schiff-Basen mit primären Aminen bildet, können höhere Konzentrationen zur Modifizierung des Lysinrestes K79 führen, der essenziell für die Enzymaktivität ist.^[9] B) Langzeitstabilitätstests zeigen, dass RebH-combiCLEAs länger als 4 Monate bei 4 °C stabil sind, während freies aufgereinigtes RebH bereits einen beträchtlichen Aktivitätsverlust nach 12 Wochen Lagerung zeigt.

am für die Enzymaktivität essenziellen Lysin K79 beinhaltet,^[9] kann dessen Modifizierung ausschlaggebend für die geringere Aktivität sein. Außerdem ist bekannt, dass übermäßige Proteinmodifizierung mit Glutaraldehyd generell zu geringeren Enzymaktivitäten führt.^[19] Unterschiedliche Vernetzungszeiten zeigten hingegen keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität. Unter optimalen Bedingungen konnte eine Immobilisierungsausbeute aller drei simultan immobilisierter Enzyme von 99 % und einer Aktivitätsrückgewinnung von 30 % erreicht werden. Langzeittests bestätigten die hohe Lagerstabilität der RebH-combiCLEAs von über 4 Monaten bei 4 °C, während das freie aufgereinigte Enzym innerhalb von 12 Wochen beträchtlich an Aktivität verlor (Abbildung 1 B).^[20]

RebH-combiCLEAs können für mindestens zehn Halogenierungen von 3 mM L-Tryptophan im Batch-Verfahren mit einem durchschnittlichen Umsatz von 81 % wiederverwendet werden, wodurch mehr als 200 mg regioselektiv bromiertes L-Tryptophan als TFA-Salz erhalten wurde (Abbildung 2).

Bemerkenswerterweise stoppen die Halogenierungen nach einer gewissen Zeit, was auf eine mögliche Limitierung, z. B. durch die Cofaktorregenerierung der ADH, hindeutet. Trotz höherer 2-Propanol-Konzentrationen oder In-situ-Produktentfernung (ISPR) des gebildeten Acetons^[21] konnte die katalytische Aktivität nicht verlängert werden. Ebenso zeigte auch eine stärkere Belüftung des Reaktionsgefäßes mit zusätzlicher Sauerstoffzufuhr keine Verbesserung der Halogenierung.^[22] Durch Verringerung der L-Tryptophan-Konzentration von 3 auf 1 mM unter zeitgleicher Vergrößerung des Volumens von 30 auf 750 mL konnte eine vollständige Halogenierung von 153 mg L-Tryptophan innerhalb von 6 Tagen erreicht werden, ohne die Reaktionslösung erneuern zu müssen (Abbildung 3). Da die enzymatische Halogenierung hoch regioselektiv ohne Bildung von Nebenprodukten verläuft, genügt eine einfache Entsalzung über Umkehrphasen-C18-Kieselgel als einziger Aufreinigungsschritt, wodurch 248 mg L-7-Bromtryptophan (TFA-Salz; 0.63 mmol, 84 %) erhalten wurden. Basierend auf diesen Ergebnissen waren wir zuversichtlich, die Halogenierung auch auf den Gramm-Maßstab hochskalieren zu können. CombiCLEAs aus 6 L

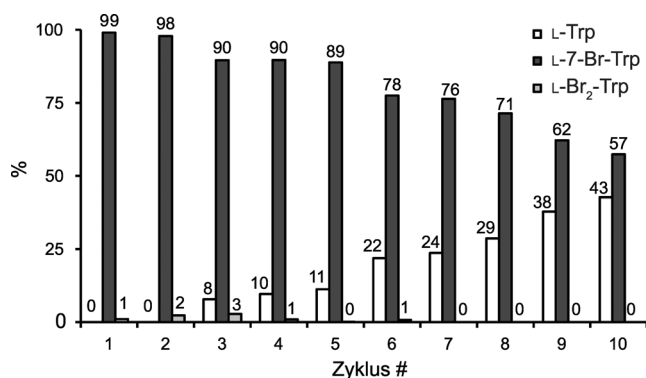


Abbildung 2. RebH-combiCLEAs aus 1.5 L *E. coli*-Kultur wurden in 30 mL Batch-Reaktionen mit 3 mM L-Tryptophan verwendet, um ihre Wiederverwendbarkeit zu testen. Nach jeder Reaktion wurde der Biokatalysator durch Zentrifugation entfernt, mit Puffer gewaschen und für den nächsten Ansatz mit neuer Reaktionslösung verwendet. RebH combiCLEAs können mindestens zehnmal mit einer durchschnittlichen Konversion von 81 % wiederverwendet werden, wodurch 204 mg L-7-Bromtryptophan (TFA Salz, 0.52 mmol, 58 %) erhalten wurden. Nach der quantitativen Halogenierung von L-Tryptophan beginnt RebH ebenso die dibromierte Spezies zu bilden.^[15] Da jedoch die erste Bromierung zu einem deutlich desaktivierten Aren führt, verläuft die zweite Bromierung sehr langsam und lediglich zu einem sehr geringen Anteil. Dieser Prozess kann durch Reaktionskontrolle und Entfernen des immobilisierten Biokatalysators verhindert werden.

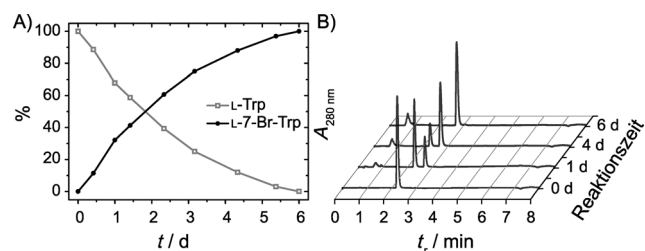


Abbildung 3. A) RebH bromiert 154 mg L-Tryptophan innerhalb von 6 Tagen ohne Erneuerung der Reaktionslösung durch die Verwendung größerer Volumina in Kombination mit geringeren Substratkonzentrationen. Mittels einfacher Entsalzung über RP-C18-Kieselgel konnten 248 mg L-7-Bromtryptophan-TFA erhalten werden. B) Entsprechend der RP-HPLC-Analyse wird L-Tryptophan ($t_r = 128$ s) mit hoher Selektivität zu L-7-Bromtryptophan ($t_r = 156$ s) ohne Bildung von Nebenprodukten halogeniert.

E. coli-Kultur einer RebH-Überexpression wurden für die Halogenierung von 1 g L-Tryptophan in einem Gesamtvolumen von 5 L verwendet. Die Reaktion erreichte vollständigen Umsatz innerhalb von 8 Tagen, wodurch 1.813 g L-7-Bromtryptophan-TFA (4.58 mmol, 92 %) in hoher Reinheit nach Entsalzung über RP-C18-Kieselgel erhalten wurde.

Da wir im Vorfeld auch das Potential von RebH zur regioselektiven Halogenierung anderer L-Tryptophanderivate an der C7-Position, selbst in Gegenwart desaktivierender *ortho/para*-dirigierender Substituenten wie Fluor, zeigen konnten,^[23] führten wir die Halogenierung von L-5-Hydroxytryptophan und auch von D-Tryptophan (Tabelle 1) ebenso mit RebH-combiCLEAs durch. Die Halogenierung ist auch für diese Substrate im präparativen Maßstab möglich, wenn auch leicht geringere Ausbeuten erreicht wurden.

Tabelle 1: Halogenierung von Tryptophan und 5-Hydroxytryptophan durch RebH.^[a]

Substrat	Konzentration	Produkt	Umsatz [%] ^[b]
L-Trp	1 mM	L-7-Brom-Trp	100
D-Trp	0.25 mM	D-7-Brom-Trp	57
5-HO-Trp	0.25 mM	7-Chlor-5-HO-Trp ^[c]	53

[a] Reaktionsbedingungen: 100 μ M NAD⁺, 1 μ M FAD, 15 mM Na₂HPO₄, 5 Vol.-% 2-Propanol und 30 mM NaBr oder NaCl in einem Gesamtvolumen von 750 mL Millipore-Wasser, pH 7.4 eingestellt mit H₃PO₄, 25 °C, 6 d. [b] Bestimmt durch RP-HPLC. [c] Gemäß ¹H-NMR-Spektroskopie wird 6-Chlor-5-hydroxytryptophan ebenso in einem 1:3-Verhältnis gebildet.

Die praktische Anwendbarkeit FAD-abhängiger Halogenasen zur präparativen regioselektiven Halogenierung wurde lange Zeit aufgrund der schlechten kinetischen Eigenschaften in Kombination mit geringen katalytischen Produktivitäten in Frage gestellt, was die Anwendung von RebH lediglich auf einen analytischen Maßstab oder geringe Ausbeuten begrenzte.

Unakzeptabel hoher Aufwand war bislang nötig, um z. B. 100 mg L-Tryptophan zu halogenieren, beispielsweise durch Verwendung von 12 L *E. coli*-Kultur nach RebH-Überexpression. Durch die Verwendung von RebH-PnF-ADH-combiCLEAs konnten wir einen einfachen enzymatischen und regioselektiven Halogenierungsprozess etablieren, der ebenfalls im Multigramm-Maßstab funktioniert. Zum ersten Mal wurde eine FAD-abhängige Halogenase mit allen Hilfsenzymen für die Cofaktorregenerierung aktiv coimmobilisiert. Die Bildung der RebH combiCLEAs stabilisiert vermutlich die Quartärstruktur dieses dimeren Enzyms,^[9] was ebenfalls für andere multimere Proteine bekannt ist.^[24] Da zahlreiche andere Tryptophan-Halogenasen wie PyrH (Trp-5-Halogenase) oder PrnA (Trp-7-Halogenase) ebenso Dimere in Lösung bilden,^[7,8] scheint die CLEA-Methode auch für diese Enzyme anwendbar zu sein, um ihre biokatalytische Anwendbarkeit zu verbessern. Durch weitere Verbesserung der mechanischen Eigenschaften der RebH-combiCLEAs, z. B. durch Vernetzung in Gegenwart bestimmter Additive wie Siloxane^[25,26] oder magnetisch funktionalisierter Trägermaterialien^[27] könnte die katalytische Effizienz weiter gesteigert werden.

Bislang steht die enzymatische Halogenierung organischer Verbindungen aufgrund des begrenzten Substratspektrums noch am Anfang. Nichtsdestotrotz legt die präparative Anwendung immobilisierter Halogenasen den Grundstein für effizientere biokatalytische Halogenierungen. Konsequenterweise fokussiert sich unsere zukünftige Arbeit auf die Erweiterung des Substratspektrums von Tryptophan zu anderen (Hetero)Arenen mittels gerichteter Evolution.

Eingegangen am 26. August 2014

Online veröffentlicht am 12. November 2014

Stichwörter: Biokatalyse · Enzymimmobilisierung · Halogenasen · Nachhaltige Synthesetechniken · Regioselektivität

- [1] J. Fauvarque, *Pure Appl. Chem.* **1996**, 68, 1713–1720.
- [2] S. Keller, T. Wage, K. Hohaus, M. Hölzer, E. Eichhorn, K. van Pée, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 2300–2302; *Angew. Chem.* **2000**, 112, 2380–2382.
- [3] E. Yeh, S. Garneau, C. T. Walsh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 3960–3965.
- [4] E. Yeh, L. J. Cole, E. W. Barr, J. M. Bollinger, Jr., D. P. Ballou, C. T. Walsh, *Biochemistry* **2006**, 45, 7904–7912.
- [5] E. Bitto, Y. Huang, C. A. Bingman, S. Singh, J. S. Thorson, G. N. Phillips, Jr., *Proteins* **2008**, 70, 289–293.
- [6] S. Flecks, E. P. Patallo, X. Zhu, A. J. Ernyei, G. Seifert, A. Schneider, C. Dong, J. H. Naismith, K. van Pée, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 9533–9536; *Angew. Chem.* **2008**, 120, 9676–9679.
- [7] C. Dong, S. Flecks, S. Unversucht, C. Haupt, K.-H. van Pée, J. H. Naismith, *Science* **2005**, 309, 2216–2219.
- [8] X. Zhu, W. De Laurentis, K. Leang, J. Herrmann, K. Ihlefeld, K.-H. van Pée, J. H. Naismith, *J. Mol. Biol.* **2009**, 391, 74–85.
- [9] E. Yeh, L. C. Blasiak, A. Koglin, C. L. Drennan, C. T. Walsh, *Biochemistry* **2007**, 46, 1284–1292.
- [10] S. Zehner, A. Kotzsch, B. Bister, R. D. Süßmuth, C. Méndez, J. A. Salas, K.-H. van Pée, *Chem. Biol.* **2005**, 12, 445–452.
- [11] C. Seibold, H. Schnerr, J. Rumpf, A. Kunzendorf, C. Hatscher, T. Wage, A. J. Ernyei, C. Dong, J. H. Naismith, K.-H. van Pée, *Biocatal. Biotransform.* **2006**, 24, 401–408.
- [12] C. M. Clouthier, J. N. Pelletier, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 1585–1605.
- [13] H. Gröger, Y. Asano, U. T. Bornscheuer, J. Ogawa, *Chem. Asian J.* **2012**, 7, 1138–1153.
- [14] R. A. Sheldon, S. van Pelt, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 6223–6235.
- [15] J. T. Payne, M. C. Andorfer, J. C. Lewis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 5271–5274; *Angew. Chem.* **2013**, 125, 5379–5382.
- [16] K. Muffler, A. R. Kuetchou Ngnigha, R. Ulber, *Chem. Ing. Tech.* **2010**, 82, 121–127.
- [17] C. B. Poor, M. C. Andorfer, J. C. Lewis, *ChemBioChem* **2014**, 15, 1286–1289.
- [18] M. Hölzer, W. Burd, H.-U. Reißig, K.-H. van Pée, *Adv. Synth. Catal.* **2001**, 343, 591–595.
- [19] D. I. Perez, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, *Adv. Synth. Catal.* **2009**, 351, 2133–2139.
- [20] Interessanterweise sind ausgiebiges Waschen der CLEAs sowie die Verwendung von Kaliumionen-freien Puffern essenziell für die CLEA-Bildung ausgehend von *E.-coli*-BL21(DE3)-Lysat aufgrund einer starken Tryptophanase-Aktivität (EC 4.1.99.1; dieses K⁺-abhängige Enzym baut das Substrat Tryptophan ab). Siehe: T. Honda, M. Tokushige, *J. Biochem.* **1986**, 100, 679–685.
- [21] K. Schroer, E. Tacha, S. Lütz, *Org. Process Res. Dev.* **2007**, 11, 836–841.
- [22] Da FADH₂ unmittelbar mit dem Sauerstoff in der Lösung reagiert sinkt der Sauerstoffpartialdruck $p(\text{O}_2)$ während der Reaktion in der Lösung innerhalb von 30 Minuten auf annähernd 0%. Die Reaktion verläuft jedoch mehrere Tage bei diesem geringen $p(\text{O}_2)$ -Wert. Bemerkenswerterweise scheint die katalytische Aktivität von RebH bei geringem Sauerstoffpartialdruck erhöht zu sein.^[3]
- [23] M. Frese, P. H. Guzowska, H. Voß, N. Sewald, *ChemCatChem* **2014**, 6, 1270–1276.
- [24] L. Wilson, L. Betancor, G. Fernández-Lorente, M. Fuentes, A. Hidalgo, J. M. Guisán, B. C. C. Pessela, R. Fernández-Lafuente, *Biomacromolecules* **2004**, 5, 814–817.
- [25] R. A. Sheldon, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, 92, 467–477.
- [26] R. A. Sheldon, *Org. Process Res. Dev.* **2011**, 15, 213–223.
- [27] R. A. Sheldon, M. J. Sorgedragar, *Non-Leachable Magnetic Cross-Linked Enzyme Aggregate*, **2012**, WO2012/023847A2.