



# Postępy w badaniach genetycznych GWAS w astmie i chorobach alergicznych

Recent findings on GWAS studies in asthma and allergic diseases

## SUMMARY

The advanced technology that allows for simultaneous analysis of hundreds of thousands polymorphisms distributed throughout the genome, called GWAS (Genome-Wide Association Studies), enabled to discover many new genetic risk variants for asthma and allergic diseases. The identification of new genes grants a better understanding of the pathophysiology of these heterogenous diseases and enables the search for new therapeutic strategies. This works aims to review the most important discoveries obtained in recent years by using novel genetic approaches.

Nowoczesna technologia umożliwiająca równoczesną analizę setek tysięcy polimorfizmów genetycznych w całym genomie, tzw. badania GWAS (ang. genome-wide association studies) pozwoliła na wykrycie wielu nowych wariantów genetycznych ryzyka rozwoju astmy i chorób alergicznych. Identyfikacja nowych genów pozwala na lepsze zrozumienie patofizjologii tych heterogenych chorób oraz umożliwia poszukiwanie nowych strategii terapeutycznych. Niniejsza praca podsumowuje najważniejsze odkrycia uzyskane w ostatnich latach za pomocą najnowszych metod stosowanych w badaniach genetycznych.



Dr n. med.  
**Beata Narożna**

Pracownia Badań Komórkowych i Molekularnych Kliniki Pneumonologii, Alergologii Dziecięcej i Immunologii Klinicznej

Kierownik Pracowni:  
Dr hab. n. med.  
Aleksandra Szczepankiewicz

Kierownik Kliniki:  
Dr hab. n. med.  
Irena Wojsyk-Banaszak

Narożna B.: Postępy w badaniach genetycznych GWAS w astmie i chorobach alergicznych. *Alergia*, 2020, 2; 17-19

Astma i choroby alergiczne to heterogenne choroby o złożonym podłożu genetycznym. Klasyczne metody badawcze takie jak analiza sprzężeń, metoda genu kandydującego oraz klonowanie pozycyjne pozwoliły na identyfikację kilkunastu genów ryzyka rozwoju choroby, jednakże dopiero nowoczesna technologia badań asocjacyjnych w skali całego genomu, tzw. GWAS (ang. genome wide association studies) pozwoliła na odkrycie wielu nowych loci ryzyka, przy jednoczesnym uwzględnieniu zróżnicowania etnicznego oraz fenotypów klinicznych. Badania GWAS w alergii i astmie zostały opisane na łamach *Alergii* 4/2012, jednakże od tamtego czasu ich liczba wzrosła niemalże pięciokrotnie [1]. Niniejsza praca skupia się więc na przeglądzie najważniejszych odkryć dotyczących badań genetycznych astmy i chorób alergicznych metodą GWAS opublikowanych w ostatnich latach.

## Wpływ wielkości grupy badanej na wyniki

Badania GWAS powinny być przeprowadzone na dużej grupie badanej celem wykrycia efektu pojedynczego genu, gdyż poszczególne warianty genetyczne mają stosunkowo niewielki wpływ na ryzyko astmy i chorób alergicznych [2]. Wielkość grupy jest również istotna ze względu na przeprowadzaną korektę wielokrotnego testowania, w rezultacie której jedynie wyniki o wartości  $P < 5 \times 10^{-8}$  uznawane są za istotne warianty ryzyka rozwoju choroby. Badania GWAS na grupie poniżej 5000 osób zazwyczaj ujawniają tylko

jedno lub dwa istotne loci, wykazując niewystarczającą moc badania. Niestety, wraz ze wzrostem w badaniu liczby osób zróżnicowanych etnicznie nasilają się też różnice kliniczne, środowiskowe i genetyczne. Skutkuje to znacznie mniejszą liczbą loci istotnych statystycznie niż w przypadku badań na populacji europejskiej. Natomiast, badania wśród dobrze zdefiniowanych podgrup fenotypowych wykazują więcej istotnych loci niż badania nad astmą oskrzelową ogółem. Na wpływ wyników ma również wielkość grupy kontrolnej, dziedziczność i dokładność fenotypu.

## Astma oskrzelowa

Jedno z najnowszych badań GWAS w astmie (64 538 osób badanych i 329 321 kontroli) z wykorzystaniem danych z bazy danych UK Biobank pozwoliło na identyfikację 32 813 polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP) w obrębie 145 loci, w tym 41 nie powiązanych do tej pory z astmą ani z fenotypem alergicznym [3]. Badacze wykonali ponadto meta-analizę swoich wyników oraz wyników będących w posiadaniu konsorcjum TAGC (Trans-National Asthma Genetic Consortium), w rezultacie której zidentyfikowali w sumie 66 nowych loci, stanowiących 1.5% odziedziczalności dla astmy. Dodatkowe analizy wykazały silny związek 4 SNP w lokalizacji 1p34.3, 2q37.3, 5q22.1 oraz 6p25.3 z płcią męską. Ponadto, pacjenci ze wszystkimi wykrytymi wariantami genetycznymi mieli pięciokrotnie wyższe ryzyko rozwoju astmy w porównaniu do osób z najmniejszą liczbą wariantów

## Słowa kluczowe:

astma, choroby alergiczne, GWAS, badania genetyczne

## Key words:

asthma, allergic diseases, GWAS, genetic studies

tów. Co ciekawe, porównania uwzględniające inne choroby alergiczne lub bardziej restrykcyjne fenotypy astmy wykazały jedynie związek większości z 66 loci z ogólną diagnozą astmy, nawet po wykluczeniu ludności o innym pochodzeniu niż europejskie. Warianty genetyczne w obrębie 24 loci wykazały asocjację z parametrami badań czynnościowych układu oddechowego. Analiza bioinformatyczna funkcji biologicznej zidentyfikowanych loci ujawniła ponad 3-krotnie częstsze występowanie wariantów ryzyka rozwoju astmy w miejscach nadwrażliwych na działanie DNazy I w nabłonku, płucach i grasicy, a także w komórkach krwi. Szlaki sygnałowe powiązane z tymi wariantami to m.in. aktywacja, różnicowanie i proliferacja leukocytów, produkcja cytokin, rozwój narządów limfatycznych.

**Autorzy badania zweryfikowali funkcjonalnie jeden z genów – glikoproteinę błonową CD52 i wykazali, że stosowanie przeciwciała  $\alpha$ CD52 w modelu zwierzęcym astmy powoduje zmniejszenie grubości nabłonka dróg oddechowych oraz nadreaktywności dróg oddechowych na alergen. Jest to o tyle istotne, że alemtuzumab, przeciwciało monoklonalne przeciwko CD52, jest dopuszczone do leczenia jednej z postaci stwardnienia rozsianego, a w przyszłości mogłyby być potencjalnie stosowane w terapii astmy.**

Meta-analiza Olafsdottir i wsp. na 68 189 pacjentach i 702 199 kontrolach wykazała 88 wariantów ryzyka rozwoju astmy w obrębie 56 loci, w tym 19 wykrytych w astmie po raz pierwszy [4]. Polimorfizmy znajdują się m.in. w genach COL16A1, IL4R $\alpha$ , SHARPIN, NSMCE1, SYMPK, SIX5, IL21R, BHMG1, NPNT, TNFAIP8, FADS1, GNA15, i IL6. Interesujące wydają się w szczególności te dwa pierwsze – COL16A1 koduje białko związane z produkcją kolagenu, którego lokalna ekspresja u chorych na astmę jest zwiększona, natomiast celowana terapia biologiczna na IL4R $\alpha$  wykazuje potencjalną skuteczność w leczeniu astmy ciężkiej. Autorzy wykonali również analizę funkcjonalną rzadszych wariantów w genach TNFRSF8 i TGFBR1, wykazując asocjację ze zmniejszonym ryzykiem rozwoju astmy. Ponadto, analiza bioinformatyczna wykazała szlaki sygnałowe związane z regulacją funkcjonowania limfocytów CD4+ T.

### Stopień ciężkości astmy

Pozostaje zagadką dlaczego niektórzy z pacjentów mają ciężką postać choroby i nie odpowiadają na standardowe leczenie. Shrine i wsp. uwzględnili więc w swoich badaniach stopień ciężkości astmy [5]. Autorzy zidentyfikowali 25 wariantów genetycznych w genach związanych głównie z odpowiedzią immunologiczną, zarówno nabytą jak i wrodzoną. Wśród nich znalazły się trzy dotąd nie powiązane z astmą geny: GATA3 (czynnik transkrypcyjny związany z odpowiedzią limfocytów T w astmie i eozynofilii), MUC5A (odpowiedzialny za produkcję mucyny) i KIAA1109 (locus powiązane z uczuleniem alergicznym); gen MUC5A był istotnie powiązany z ryzykiem choroby jedynie po wykluczeniu grupy pacjentów z łagodną astmą. Polimorfizm w genie MUC5AC może niekorzystnie zmieniać stosunek ekspresji tego genu w stosunku do MUC5B, zwiększając jego właściwości patogenne i nasilając reakcję nadreaktywności dróg oddechowych i produkcję śluzu podczas zaostrzenia choroby.

**Niewielka ilość różnych wariantów genetycznych sugeruje, iż astma umiarkowana i ciężka mają podobną architekturę genetyczną do astmy łagodnej.**

### Wiek początku astmy

Dwa badania porównywały pacjentów z różnych grup wiekowych: Pividori i wsp. analizowali dzieci o początku choroby do 12 roku życia i dorosłych o początku choroby między 26 a 65 rokiem życia, natomiast Ferreira i wsp. badali pacjentów zdiagnozowanych przed 19 rokiem życia i pacjentów w przedziale wieku 20-60 lat [6, 7]. Pierwsza grupa badawcza zidentyfikowała 61 loci (28 nowych) związanych z astmą, 56 związanych z astmą o wczesnym początku i 19 z astmą dorosłych, natomiast druga odkryła 142 loci związanych z astmą ogólnie, 123 z astmą wieku dziecięcego oraz 56 z astmą dorosłych. Większa liczba loci u Ferreira i wsp. jest zapewne wynikiem szerszej definicji astmy dziecięcej (pacjenci do lat 18).

**Najbardziej istotne genetyczne czynniki ryzyka rozwoju astmy dziecięcej to wg. Pividori i wsp. polimorfizmy w genie filagryny, białka warunkującego prawidłową barierową funkcję naskórka.**

**Ponadto, analizy bioinformatyczne wykazały, iż geny zwiększające ryzyko astmy dziecięcej ulegały największej ekspresji w naskórku, krwi oraz jelicie cienkim, natomiast ekspresja genów związanych z astmą dorosłych była najwyższa w płucach i śledzionie, a w mniejszym stopniu także w krwi, jelicie cienkim.**

Sugeruje to, iż astma dorosłych dotyczy głównie płuc i jest modulowana przez układ immunologiczny, podczas gdy przyczyną astmy dziecięcej jest głównie nieprawidłowa funkcja bariery naskórkowej nasilającą nieprawidłowe działanie układu immunologicznego.

### Odpowiedź na leczenie

Okolo 35-40% pacjentów po 8-12 tygodniach leczenia glikokortykosteroidami wziewnymi nie uzyskuje poprawy w parametrach czynnościowych układu oddechowego, a 10% pacjentów w trakcie terapii posiada wysokie ryzyko wystąpienia ataku astmy [8]. W badaniach GWAS Wanga i wsp. 120 dorosłych pacjentów ze zdiagnozowaną astmą otrzymywało różne dawki glikokortykosteroidów (125, 250, 500, 1000 mcg), zwiększane cotygodniowo [9]. Pozwoliło to na wykrycie asocjacji pomiędzy zależną od dawki poprawą czynnościową układu oddechowego i pięcioma loci na chromosomach 6, 8, 11 i 15, związanych z funkcjami życiowymi komórki. Dwa inne badania dotyczące leczenia astmy glikokortykosteroidami w populacji pediatrycznej nie wykazały istotnych statystycznie wariantów genetycznych po korekcie wielokrotnego testowania.

### Astma i inne choroby alergiczne

Badanie Zhu i wsp. wykazało silną korelację genetyczną między astmą i chorobami alergicznymi ( $r_g = 0.75$ ,  $P = 6.84 \times 10^{-62}$ ) oraz brak związku z innymi chorobami układu immunologicznego (m.in. reumatoidalnym zapaleniem stawów, chorobą Leśniowskiego-Crohna) [10]. Zidentyfikowano



32 istotnych statystycznie dla astmy loci (IL1R1, IL1RL1, IL18R1, IL13, SLC25A46, regiony HLA, SMAD3, GSDMB i inne), w tym 6 nowych. Odkryto również 33 loci związanych z chorobami alergicznymi, m. in.: HLA-DQB, C11orf30, FLG, SLC25A46, TMEM232, CAMK4, TSLP, WDR36, CLEC16 i DEX. Sześć polimorfizmów i 22 loci wykazało asocjację z ryzykiem rozwoju astmy i chorób alergicznych (geny D2HGDH, GAL3ST2, SLC25A46, TMEM232, HV745896, C11orf30, SMAD3, SLC7A10).

**Analizy bioinformatyczne wykazały, iż zidentyfikowane geny wchodziły w skład szlaków sygnałowych dotyczących układu immunologicznego oraz nabłonka dróg oddechowych.**

### Atopowe zapalenie skóry

Meta-analiza 26 badań GWAS objęła w sumie 21 399 pacjentów i 95 464 kontrole, co pozwoliło na wykrycie 10 nowych loci związanych z ryzykiem zachorowania [11].

**Warianty genetyczne obejmują m.in. geny MRPS21, ZBTB10, IL2RA, IL7R, PUS10, STAT3, SFMBT1 i VAX2, które kodują białka modyfikujące transkrypcję i odpowiedź immunologiczną.**

### Alergiczny nieżyt nosa

Największe badanie GWAS objęło 59 762 pacjentów oraz 152 358 kontrole, co pozwoliło na identyfikację

kację 41 loci ryzyka zachorowania, w tym 20 nowych, dotychczas nie powiązanych z chorobą, dodatkowo potwierdzonych w grupie 60 720 chorych i 618 527 osób zdrowych [12].

**Warianty genetyczne dotyczą genów odpowiedzialnych głównie za odpowiedź immunologiczną: IL7R, SH2B3, CEBPA/CEBPG, CXCR5, FCER1G, NFKB1, BACH2, TYRO3, LTK, VPRBP, SPPL3, OASL, RORA i TNFSF1.**

### Podsumowanie

Wyżej opisane wyniki badań GWAS wyraźnie podkreślają różnorodność genetyczną w uwarunkowaniu chorób alergicznych. Większość przedstawionych badań wykorzystuje zbiory pochodzące z genetycznych baz danych, zbieranych systematycznie przez wiele lat, co umożliwia zwiększenie grupy badanej, polepszenie mocy badania i w rezultacie wykrycie nowych loci związanych z chorobą. Istotny wpływ na wyniki ma także prawidłowy podział pacjentów na podgrupy w zależności od fenotypu klinicznego. Kolejnym etapem badań GWAS jest analiza funkcjonalna, która wyjaśni wpływ danego polimorfizmu na ryzyko zachorowania i przebieg choroby, a w rezultacie umożliwi powstanie nowych strategii terapeutycznych.

**Prace nadesłano  
16.07.2020  
Zaakceptowano do  
druku 30.07.2020**

Konflikt interesów nie występuje. Treści przedstawione w artykule są zgodne z zasadami Deklaracji Helsińskiej, dyrektywami EU oraz ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.

**Piśmiennictwo:** 1. A. S. Badania GWAS - nowa strategia badań genetycznych w alergii i astmie. *Alergia*. 2012;4:14-6. 2. Schoettler N, Rodriguez E, Weidinger S, Ober C. Advances in asthma and allergic disease genetics: Is bigger always better? *J Allergy Clin Immunol*. 2019;144(6):1495-506. 3. Han Y, Jia Q, Jahani PS, Hurrell BP, Pan C, Huang P, et al. Genome-wide analysis highlights contribution of immune system pathways to the genetic architecture of asthma. *Nat Commun*. 2020;11(1):1776. 4. Olafsdottir TA, Theodoris F, Bjarnadottir K, Bjornsdottir US, Agustsdottir AB, Stefansson OA, et al. Eighty-eight variants highlight the role of T cell regulation and airway remodeling in asthma pathogenesis. *Nat Commun*. 2020;11(1):393. 5. Shrine N, Portelli MA, John C, Soler Artigas M, Bennett N, Hall R, et al. Moderate-to-severe asthma in individuals of European ancestry: a genome-wide association study. *Lancet Respir Med*. 2019;7(1):20-34. 6. Pividori M, Schoettler N, Nicolae DL, Ober C, Im HK. Shared and distinct genetic risk factors for childhood-onset and adult-onset asthma: genome-wide and transcriptome-wide studies. *Lancet Respir Med*. 2019;7(6):509-22. 7. Ferreira MAR, Mathur R, Vonk JM, Szwejda A, Brumpton B, Granell R, et al. Genetic Architectures of Childhood- and Adult-Onset Asthma Are Partly Distinct. *Am J Hum Genet*. 2019;104(4):665-84. 8. Keskin O, Farzan N, Birben E, Akel H, Karaaslan C, Maitland-van der Zee AH, et al. Genetic associations of the response to inhaled corticosteroids in asthma: a systematic review. *Clin Transl Allergy*. 2019;9:2. 9. Wang Y, Tong C, Wang Z, Wang Z, Mauder D, Tantisira KG, et al. Pharmacodynamic genome-wide association study identifies new responsive loci for glucocorticoid intervention in asthma. *Pharmacogenomics J*. 2015;15(5):422-9. 10. Zhu Z, Lee PH, Chaffin MD, Chung W, Loh PR, Lu Q, et al. A genome-wide cross-trait analysis from UK Biobank highlights the shared genetic architecture of asthma and allergic diseases. *Nat Genet*. 2018;50(6):857-64. 11. Paternoster L, Standl M, Waage J, Baurecht H, Holze M, Strachan DP, et al. Multi-ancestry genome-wide association study of 21,000 cases and 95,000 controls identifies new risk loci for atopic dermatitis. *Nat Genet*. 2015;47(12):1449-56. 12. Waage J, Standl M, Curtin JA, Jessen LE, Thorsen J, Tian C, et al. Genome-wide association and HLA fine-mapping studies identify risk loci and genetic pathways underlying allergic rhinitis. *Nat Genet*. 2018;50(8):1072-80.

**Piśmiennictwo ze str. 38:** 1. Cabanillas B. Gluten-related disorders: Celiac disease, wheat allergy, and nonceliac gluten sensitivity. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2019;1-16. 2. Sharma N, Bhatia S, Chunduri V, et al. Pathogenesis of Celiac Disease and Other Gluten Related Disorders in Wheat and Strategies for Mitigating Them. *Front Nutr*. 2020;7:6. 3. Ludvigsson JF, Leffler DA, Bai JC, et al. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut*. 2013;62(1):43-52. 4. Rubio-Tapia A, Murray JA. Celiac disease. *Curr Opin Gastroenterol*. 2010;26(2):116-22. 5. Singh P, Arora A, Strand TA, et al. Global Prevalence of Celiac Disease: Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2018;16(6):823-36 e2. 6. Assa A, Waisbourd-Zinman O, Daher S, et al. Birth Month as a Risk Factor for the Diagnosis of Celiac Disease Later in Life: A Population-based Study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2018;67(3):367-70. 7. Roy A, Mehra S, Kelly CP, et al. The association between socioeconomic status and the symptoms at diagnosis of celiac disease: a retrospective cohort study. *Therap Adv Gastroenterol*. 2016;9(4):495-502. 8. Szajewska H, Shamir R, Chmielewska A, et al. Systematic review with meta-analysis: early infant feeding and coeliac disease—update 2015. *Aliment Pharmacol Ther*. 2015;41(11):1038-54. 9. Al-Toma A, Volta U, Auricchio R, et al. European Society for the Study of Coeliac Disease (ESsCD) guideline for coeliac disease and other gluten-related disorders. *United European Gastroenterol J*. 2019;7(5):583-613. 10. Lebewohl B, Spechler SJ, Wang TC, et al. Use of proton pump inhibitors and subsequent risk of celiac disease. *Dig Liver Dis*. 2014;46(1):36-40. 11. Dydenborg Sander S, Nybo Andersen AM, Murray JA, et al. Association Between Antibiotics in the First Year of Life and Celiac Disease. *Gastroenterology*. 2019;156(8):2217-29. 12. Cukrowska B, Sowinska A, Bierla JB, et al. Intestinal epithelium, intraepithelial lymphocytes and the gut microbiota - Key players in the pathogenesis of celiac disease. *World J Gastroenterol*. 2017;23(42):7505-18. 13. Czajka-Bulska G, Bulska M. What Do We Know Now about IgE-Mediated Wheat Allergy in Children? *Nutrients*. 2017;9(1). 14. Cianferoni A. Wheat allergy: diagnosis and management. *J Asthma Allergy*. 2016;9:13-25. 15. Velikova T. Challenges and updates in the management of eosinophilic esophagitis. *Prz Gastroenterol*. 2020;15(1):27-33. 16. Ricci G, Andreozzi L, Cipriani F, et al. Wheat Allergy in Children: A Comprehensive Update. *Medicina (Kaunas)*. 2019;55(7). 17. Rubio-Tapia A, Hill ID, Kelly CP, et al. ACG clinical guidelines: diagnosis and management of celiac disease. *Am J Gastroenterol*. 2013;108(5):656-76. 18. Majsiak E, Bierla JB, Bielawski K, et al. Frequency and duration of symptoms prior to diagnosis of coeliac disease in Polish population. 17th International Celiac Disease Symposium, New Delhi, India 2017; Abstract Book P037. 19. O'Shea KM, Aceves SS, Dellon ES, et al. Pathophysiology of Eosinophilic Esophagitis. *Gastroenterology*. 2018;154(2):333-45. 20. Czajka-Bulska G, Bulska M. The natural history of IgE mediated wheat allergy in children with dominant gastrointestinal symptoms. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2014;10(1):12. 21. Raulf M, Quirce S, Vandenplas O. Addressing Molecular Diagnosis of Occupational Allergies. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2018;18(1):6. 22. Ludvigsson JF, Bai JC, Biagi F, et al. Diagnosis and management of adult coeliac disease: guidelines from the British Society of Gastroenterology. *Gut*. 2014;63(8):1210-28. 23. Szajewska H. Celiakia. <https://www.mppol.interna/chapter/B16ll410> [Dostęp z dnia 24.03.2020]. 2019. 24. Husby S, Murray JA, Katzka DA. AGA Clinical Practice Update on Diagnosis and Monitoring of Celiac Disease—Changing Utility of Serology and Histologic Measures: Expert Review. *Gastroenterology*. 2019;156(4):885-89. 25. Oberhuber G, Granditsch G, Vogelsang H. The histopathology of coeliac disease: time for a standardized report scheme for pathologists. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999;11(10):1185-94. 26. Riddell MS, Murray JA, Porter CK. The incidence and risk of celiac disease in a healthy US adult population. *Am J Gastroenterol*. 2012;107(8):1248-55. 27. Ierardi E, Losurdo G, Piscitelli D, et al. Seronegative celiac disease: where is the specific setting? *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*. 2015;8(2):110-6. 28. Kleine-Tebbe J, Jakob T. Molecular Allergy Diagnostics. Innovation for a Better Patient Management. Springer International Publishing Switzerland. 2017. 29. Majsiak E. FABER. Nowa generacja testów molekularnych do diagnozowania alergii IgE-zależnych. *Alergia*. 2017;1. 30. Shewry PR, Hey SJ. The contribution of wheat to human diet and health. *Food Energy Secur*. 2015;4(3):178-202. 31. Sarnasca G, Lerner A, Girbovan A, et al. Challenges in gluten-free diet in coeliac disease: Prague consensus. *Eur J Clin Invest*. 2017;47(5):394-97. 32. Lerner A, O'Bryan T, Matthias T. Navigating the Gluten-Free Boom: The Dark Side of Gluten Free Diet. *Front Pediatr*. 2019;7:414. 33. Koerner TB, Cleroux C, Poirier C, et al. Gluten contamination in the Canadian commercial oat supply. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2011;28(6):705-10. 34. Gilissen L, van der Meer IM, Smulders MJM. Why Oats Are Safe and Healthy for Celiac Disease Patients. *Med Sci (Basel)*. 2016;4(4).