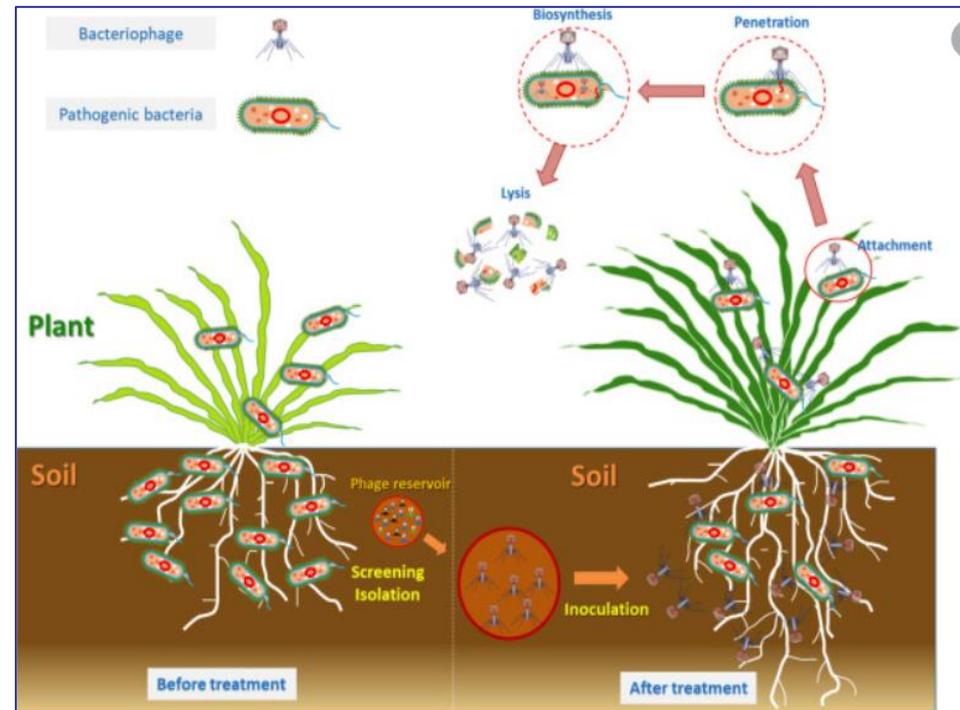
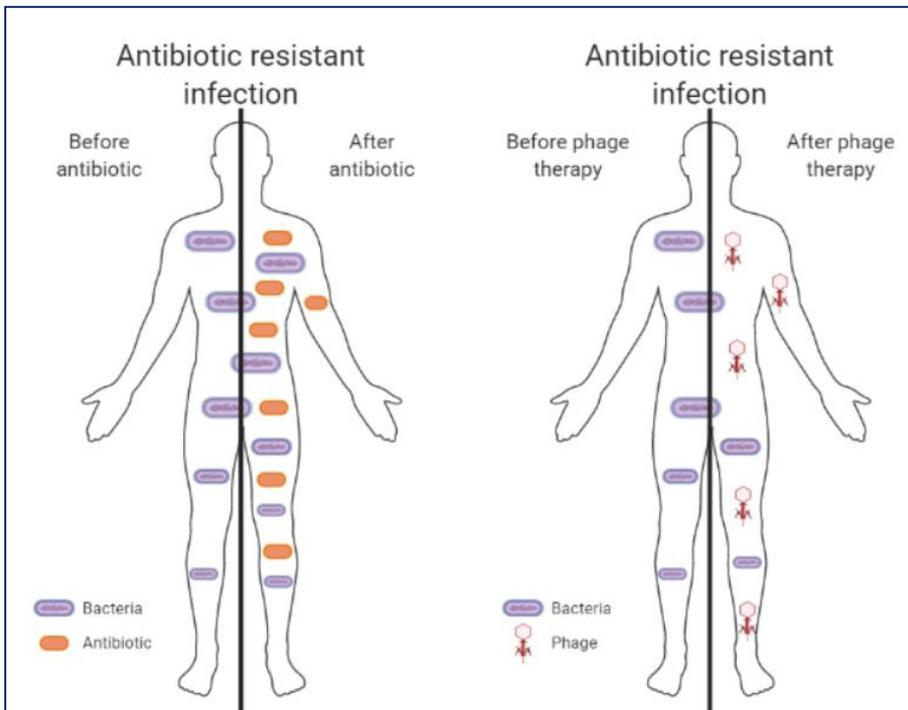


Perché studiare i batteriofagi è così importante ed attuale?

1. La Phage-therapy o terapia fagica

per aggredire batteri multi
resistenti agli antibiotici

per aggredire batteri patogeni
per le piante



2. Scoperta di nuovi sistemi importanti per lo studio e modificazione del genoma negli eucarioti

Sistema CRISPR-CAS per correzioni del genoma è una strategia di difesa del batterio verso i batteriofagi



NOBELPRISET I KEMI 2020
THE NOBEL PRIZE IN CHEMISTRY 2020



KUNGL.
VETENSKAPS-
AKADEMIEN

THE ROYAL SWEDISH ACADEMY OF SCIENCES



Photo: HeliCaen/IFromis

Emmanuelle Charpentier



Photo: UC Berkeley/Clascha Lab

Jennifer A. Doudna

"för utveckling av en metod för genomeditering"

"for the development of a method for genome editing"

#nobelprize



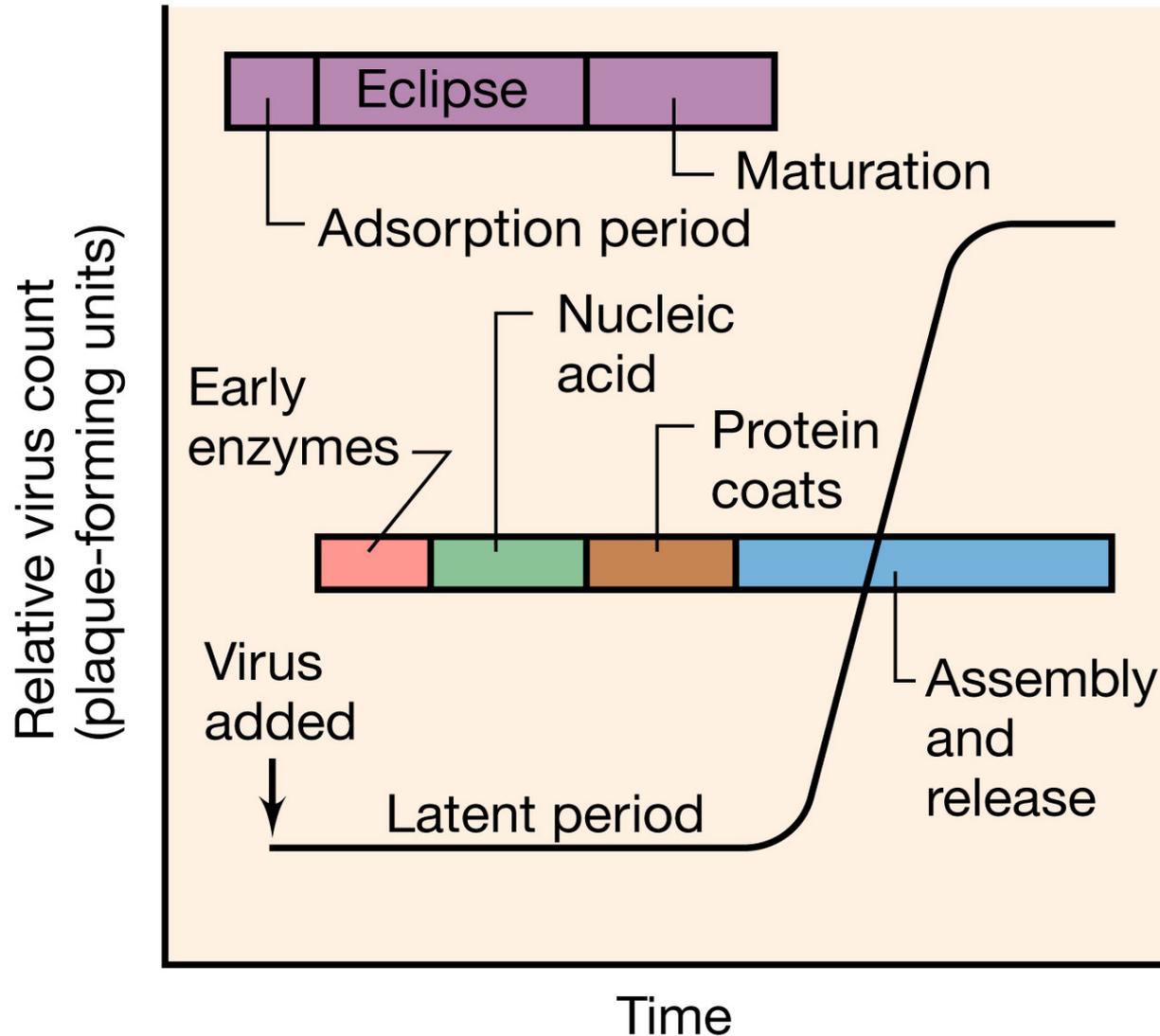
La scoperta dei batteriofagi

Nel 1896 Ernest Hankin osservò la presenza nelle acque del Gange di particelle filtrabili in grado di uccidere *Vibrio cholerae*.

Nel 1915 Frederik Twort ipotizzò la presenza di particelle invisibili in grado di distruggere i batteri

Ma si deve a **F. D'Herelle nel 1917** (Istituto Pasteur di Parigi) la definizione di virus specifici in grado di degradare i batteri.

Curva di moltiplicazione virale



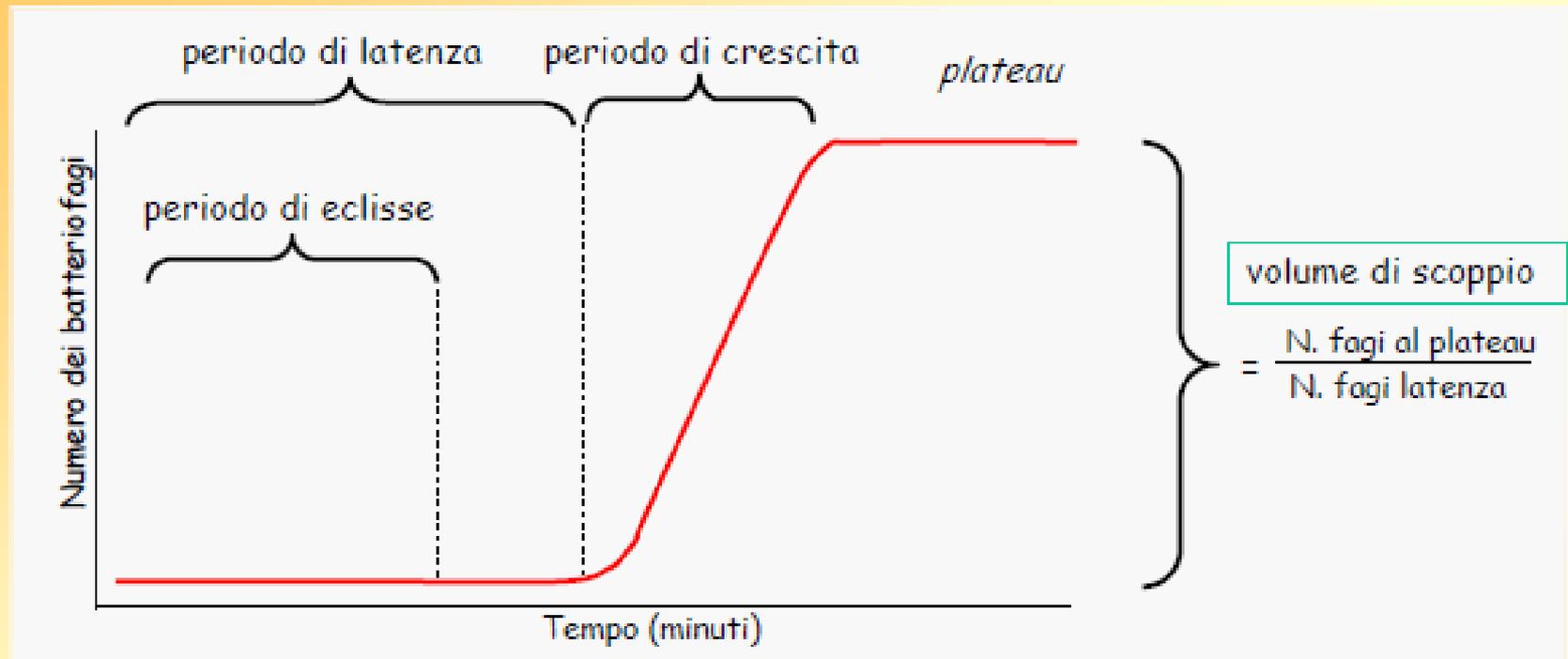
ECLISSI: dopo l'assorbimento vi è la scomparsa delle particelle virale infettive dovuto alla spoliazione (rimozione del capsido delle particelle virali)

PERIODO LATENTE: replicazione dell'acido nucleico e sintesi delle proteine virali

MATURAZIONE: genoma e proteine virali vengono assemblate in virioni maturi, se le cellule vengono disgregate si può rilevare virus maturo

RILASCIO: può avvenire con o senza lisi della cellula ospite

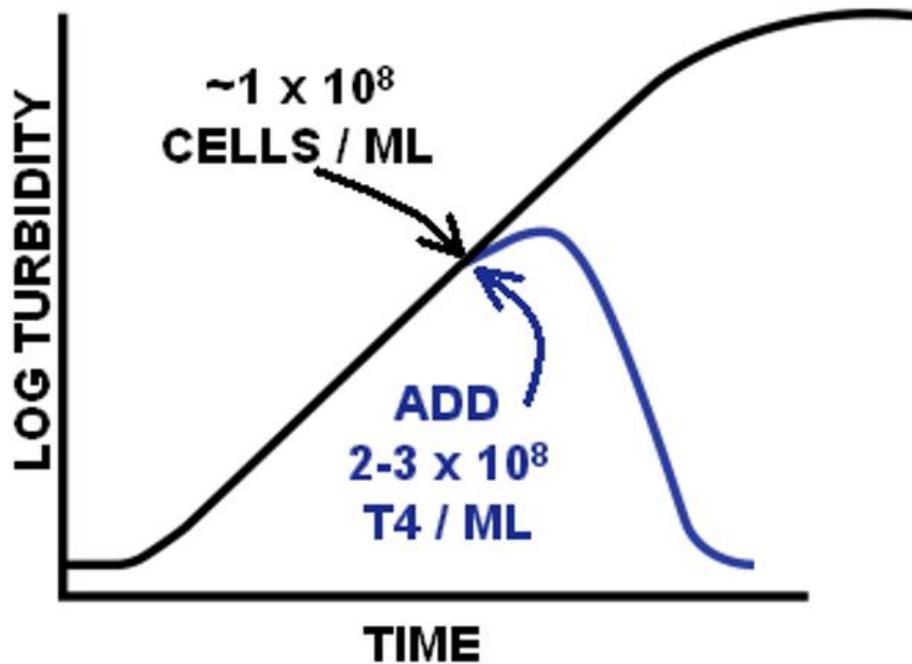
Curva di crescita a ciclo unico



periodo di eclisse: periodo durante il quale non è possibile rilevare la presenza di particelle virali infettive neanche all'interno dei batteri

periodo di latenza: periodo di sviluppo dei fagi nel batterio infettato. I fagi non sono ancora liberati all'esterno. Nella fase finale sono presenti particelle mature nel batterio.

periodo di crescita: le cellule vanno incontro a lisi liberando i fagi infettanti. Quando tutti i batteri infettati saranno lisati si raggiunge il *plateau*

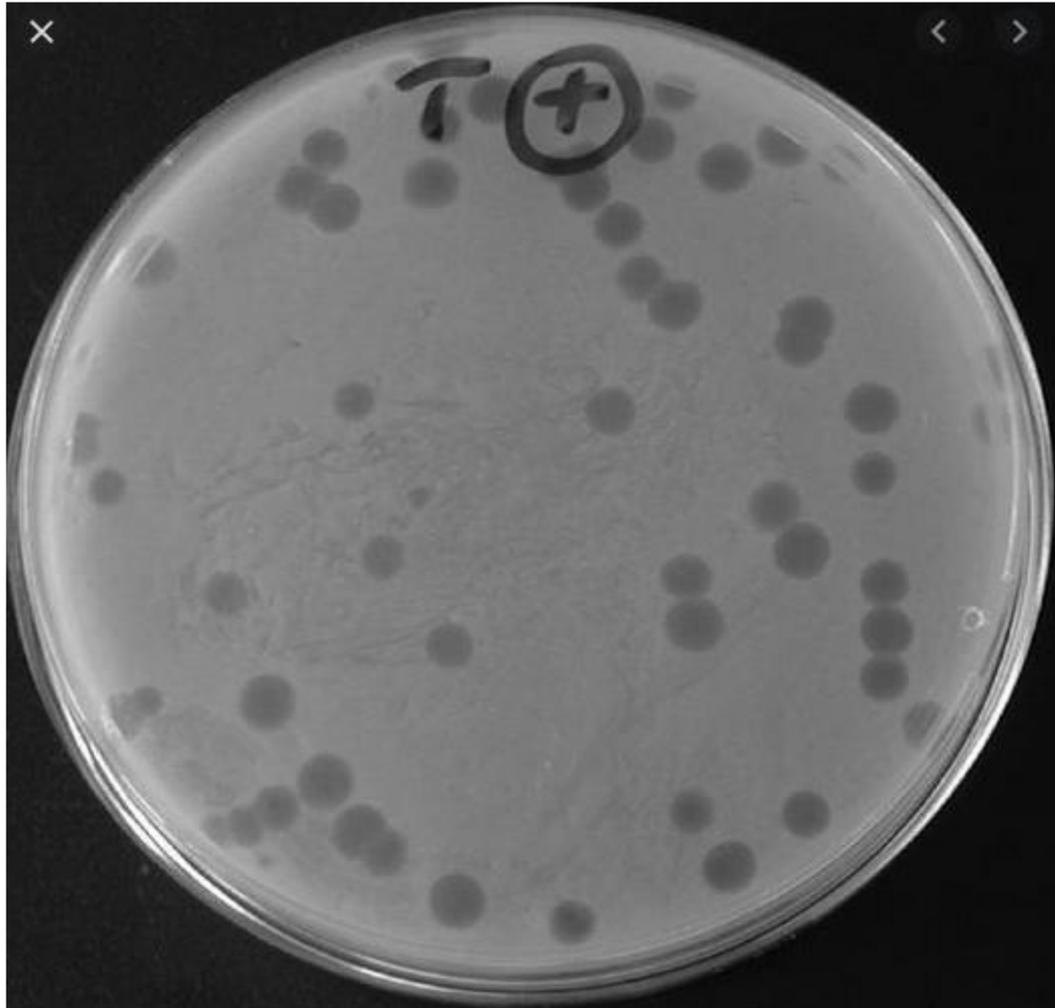


In seguito all'aggiunta di un fago virulento come fago T4 ad alta molteplicità d'infezione in una coltura in crescita esponenziale si osserva nel giro di qualche generazione la completa lisi delle cellule batteriche

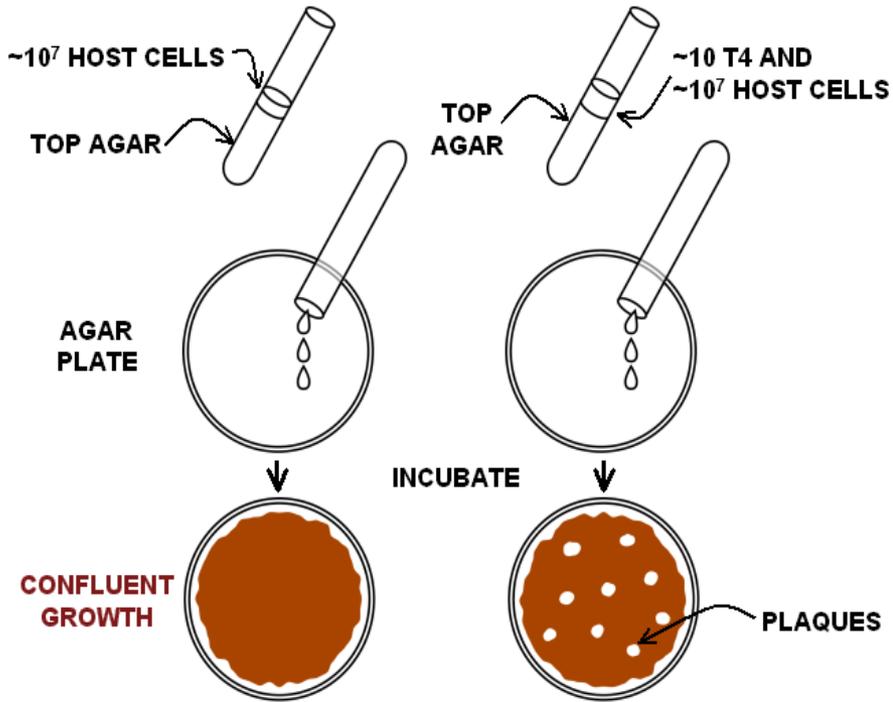
Il n° di particelle fagiche aumenterà rapidamente dopo un periodo di eclisse

Ogni cellula infettata produrrà infatti una progenie fagica di circa **100** fagi che a loro volta infetteranno altre cellule. Sopravviveranno solo le cellule resistenti al fago T4

I batteriofagi possono crescere su uno strato di cellule batteriche producendo placche di lisi.

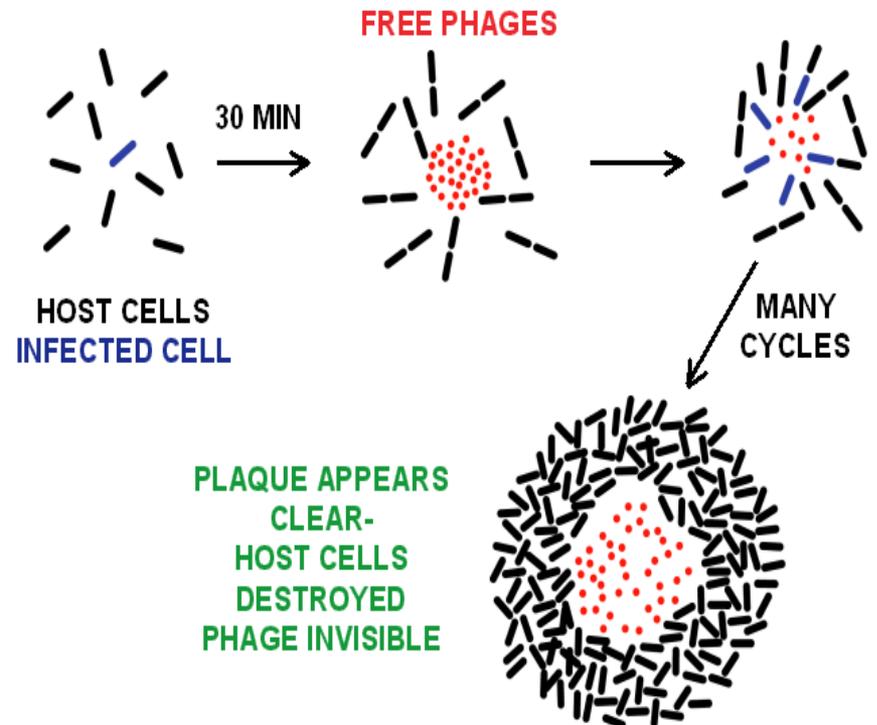


PHAGE PLAQUES

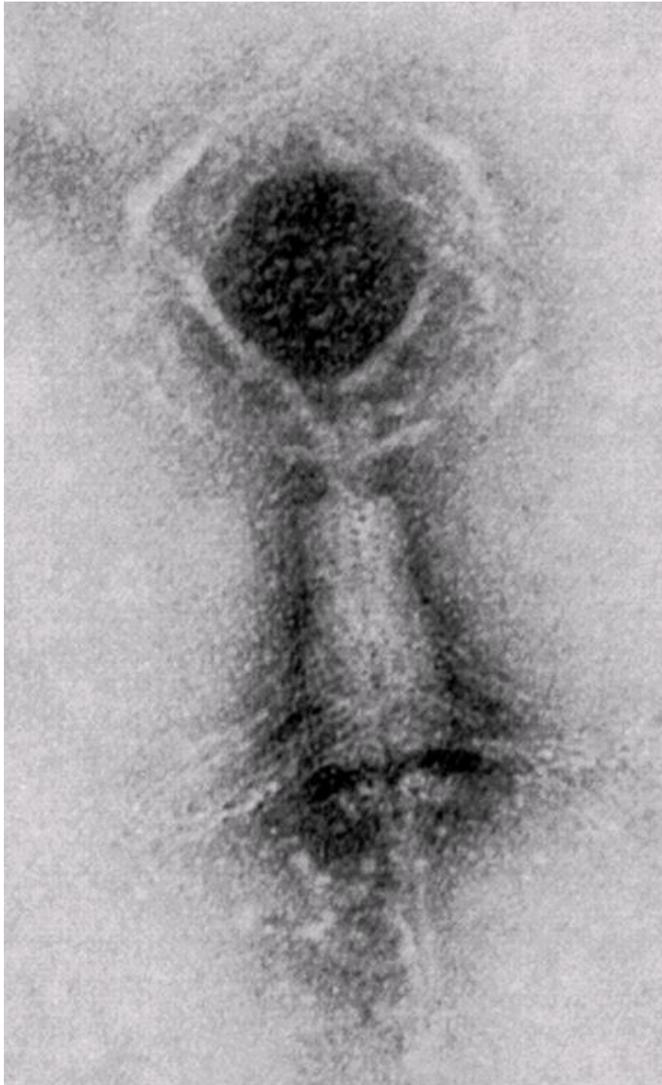


Come si origina una placca fagica?

PLAQUE FORMATION BY LYTIC (VIRULENT) PHAGE



Struttura di un batteriofago modello



Testa icosaedrica a cui è collegata una coda complessa costituita da un collare, una guaina e una piastra basale con fibre caudali coinvolte nel riconoscimento della cellula batterica .

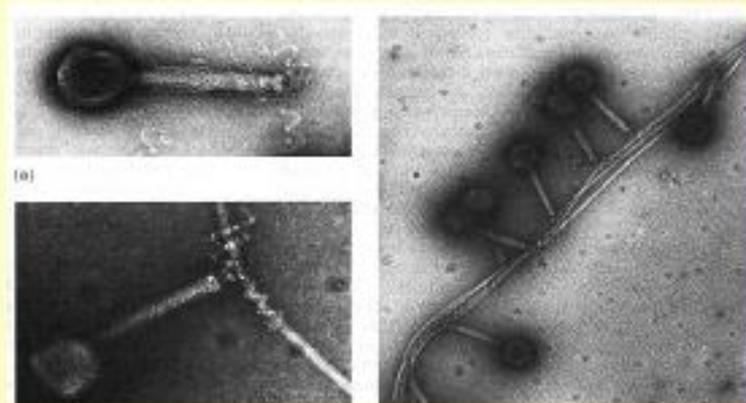
L'adsorbimento dei batteriofagi

I batteriofagi non aderiscono a un punto qualunque della superficie batterica ma riconoscono **recettori** specifici

I recettori sono normali componenti della superficie dell'ospite quali **proteine della parete, polisaccaridi, lipopolisaccaridi, acidi teicoici, flagelli e pili**

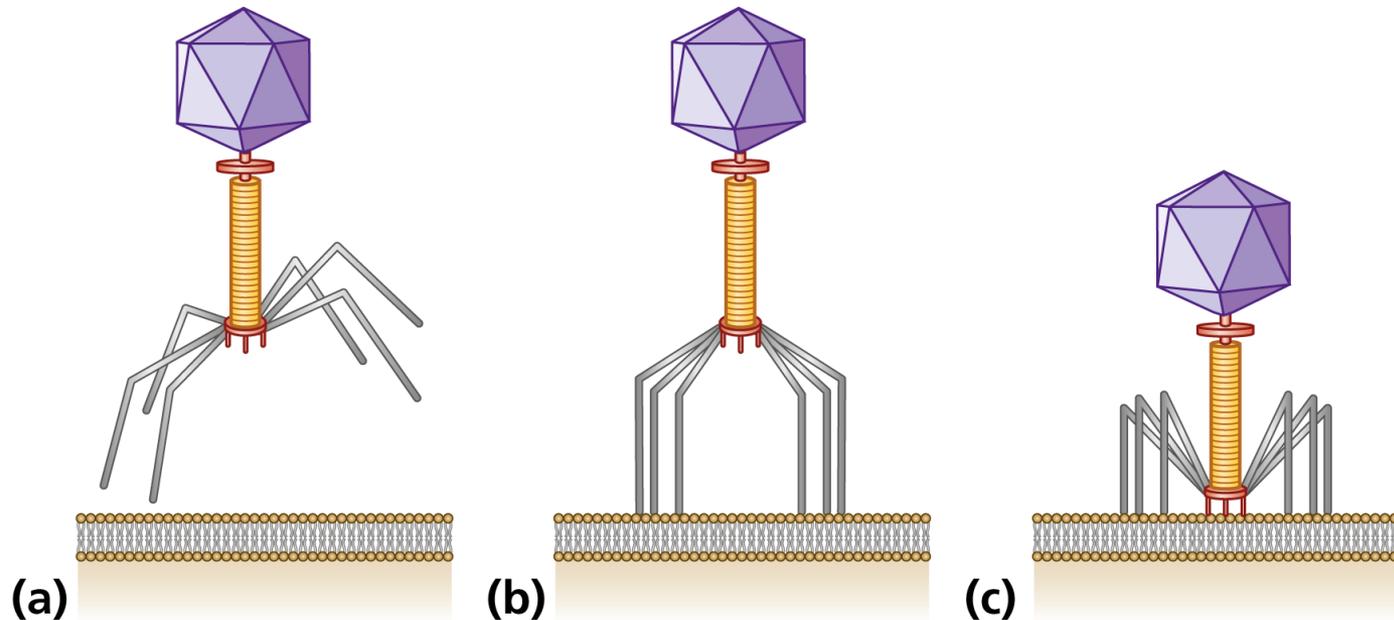
In assenza di siti recettoriali il virus non può adsorbirsi

Se un recettore è alterato, l'ospite diventa resistente alla infezione da parte del virus che usa quel recettore. Tuttavia, anche i virus possono mutare per la struttura che riconosce il recettore tornando, così, capaci di infettare un ospite resistente



Fago PBSI di *B. subtilis*

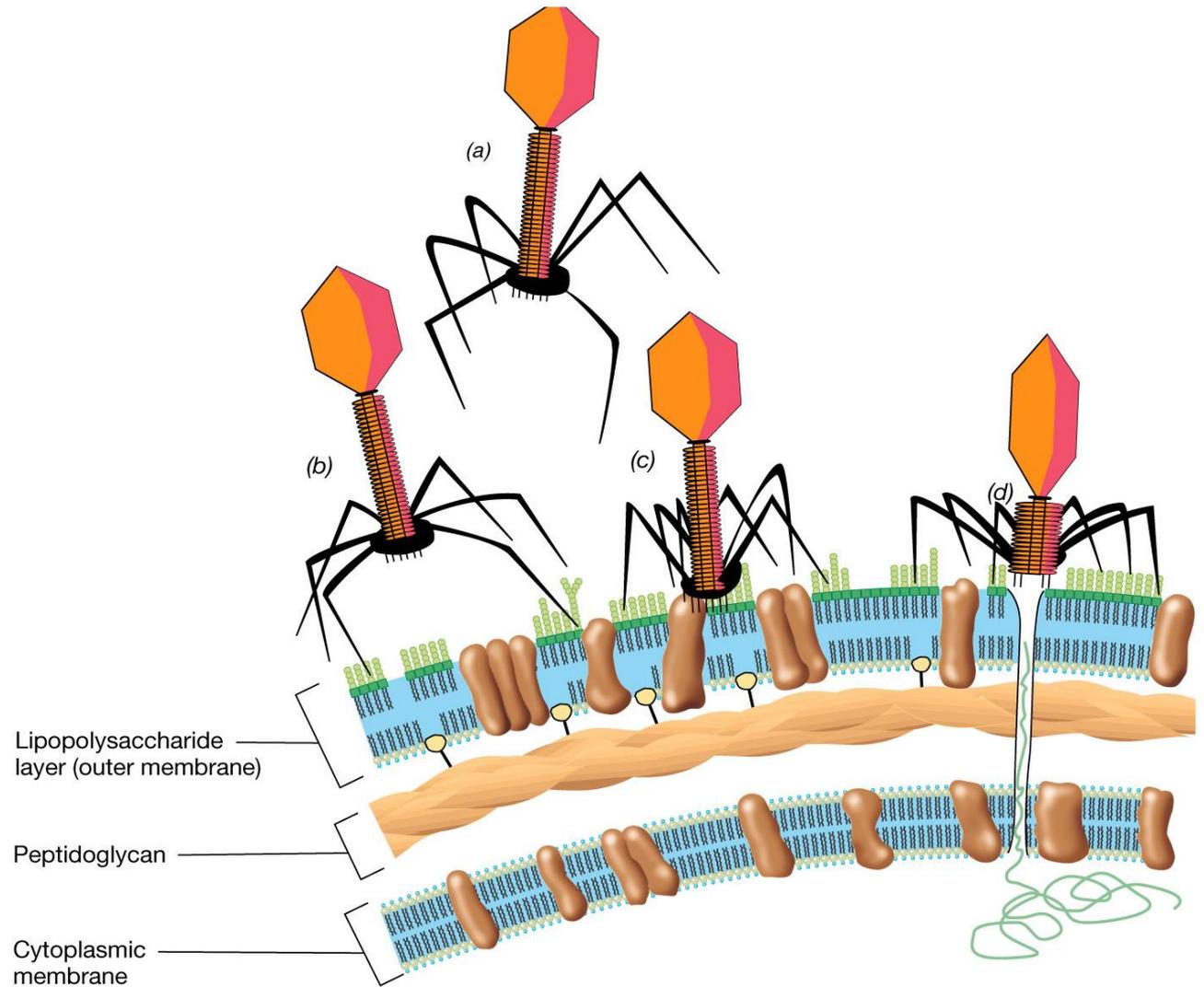
Interazione batteriofago – cellula ospite



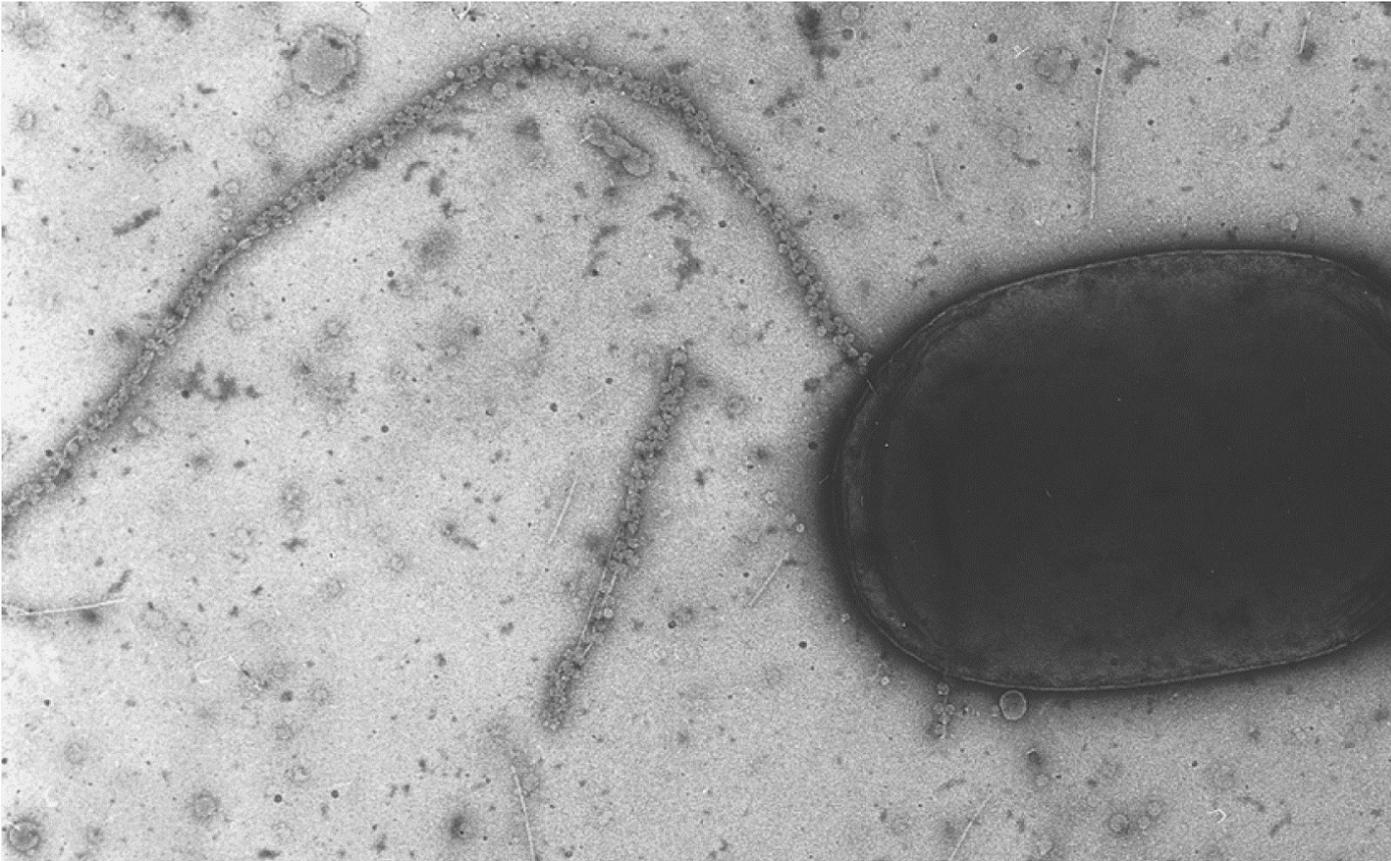
La maggior parte dei fagi interagisce con la parete cellulare dei batteri attraverso la parte terminale della coda.

La fase iniziale del contatto è mediata dalle estremità delle lunghe fibre della coda. Dopo l'attacco la particella si avvicina alla superficie cellulare. Quando la piastra basale si viene a trovare a circa 10nm dalla parete cellulare avviene il contatto tra le corte spine che si estendono dalla piastra basale e la parete cellulare

A differenza dei fagi, i virus animali non hanno mai elaborato le code necessarie per l'iniezione dei geni attraverso la parete cellulare dei batteri.



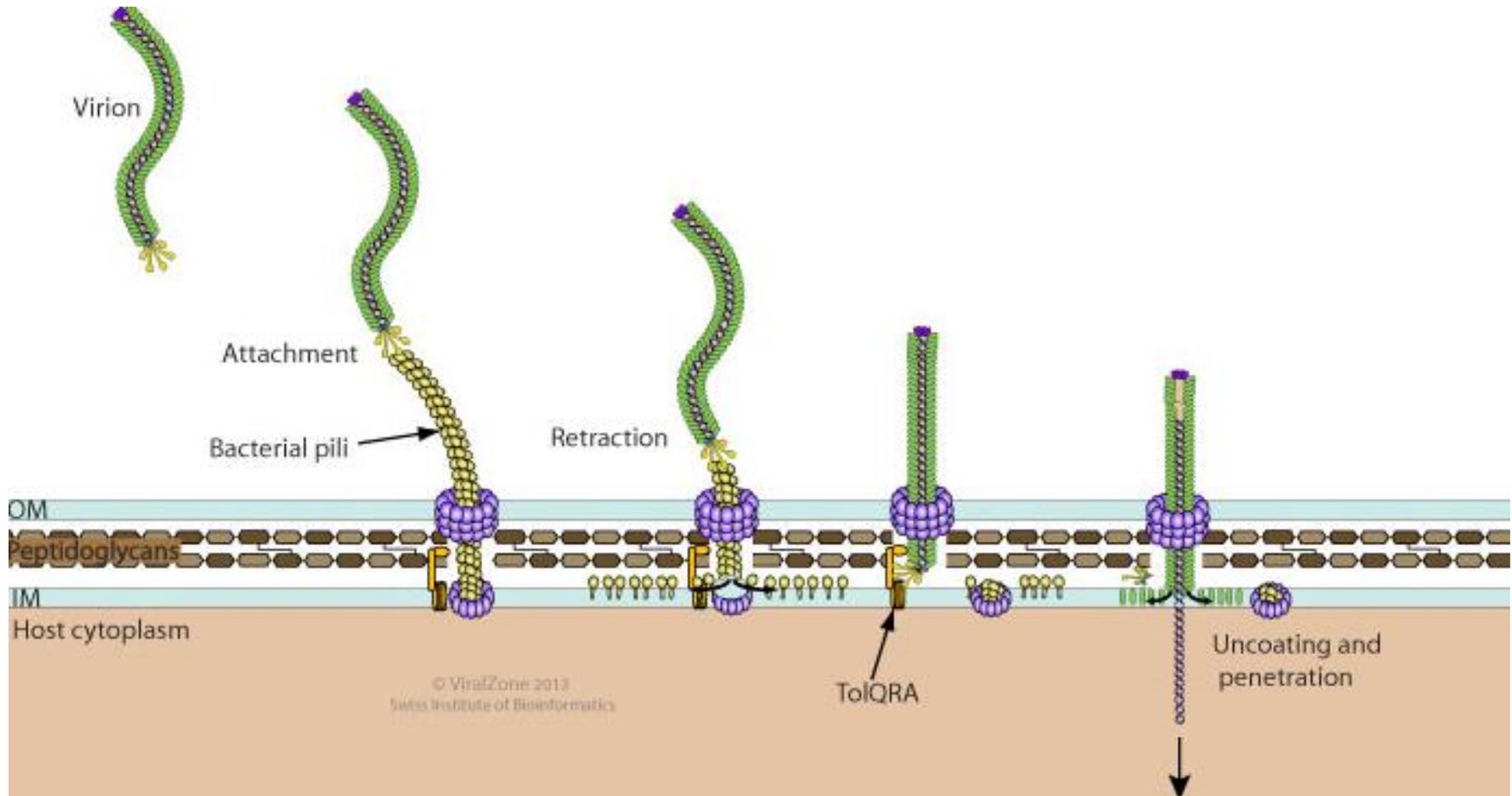
Nei fagi la componente di rivestimento rimane all'esterno della cellula Batterica infettata



Attacco di numerosi fagi sferici a RNA al pilo sessuale di *Escherichia coli*. (

Alcuni fagi possono riconoscere come sito di legame i pili. Sono note due classi che si legano ai pili : i fagi sferici con genoma ad RNA si legano lungo il pilo mentre il fago M13 con genoma a DNASS si attacca alla punta dei pili.

Il fago M13 riconosce tramite alcune proteine localizzate sull'estremità del fago (G3P) la punta del pilo di F che ritraendosi favorisce il contatto tra fago e parete cellulare

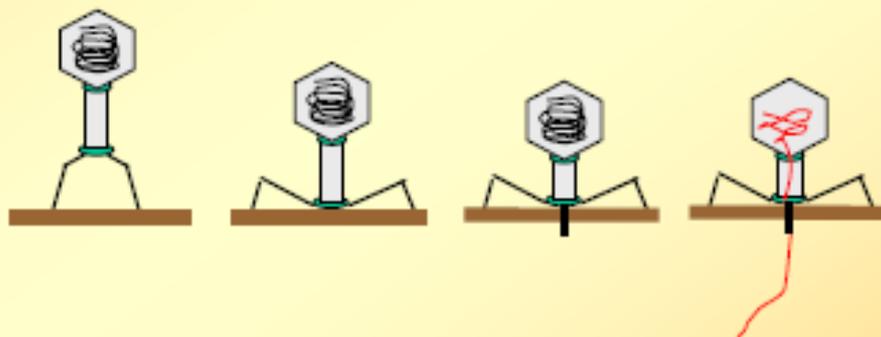


Penetrazione dell'acido nucleico

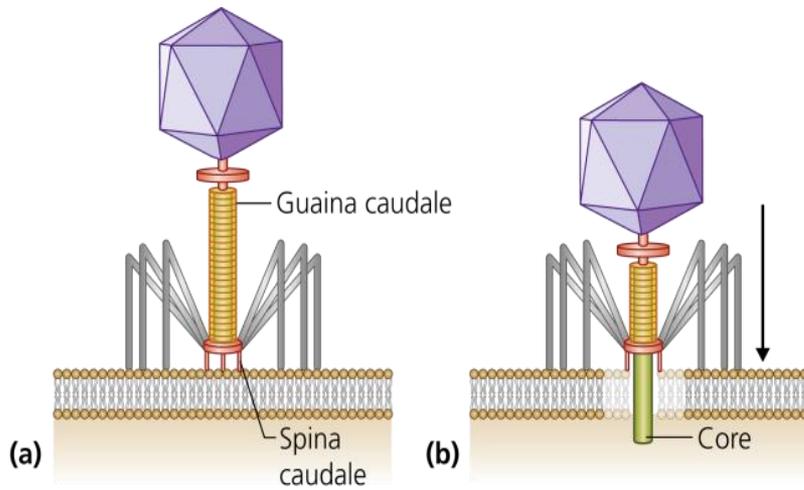
Nella gran maggioranza dei batteriofagi è solo l'acido nucleico virale a entrare nel batterio.

I meccanismi di penetrazione differiscono notevolmente tra i diversi fagi finora studiati e sono in gran parte ancora oscuri.

Nei fagi T-pari l'adsorbimento è dovuto al contatto tra le fibre caudali e il recettore (proteina della membrana esterna). La penetrazione del DNA si verifica dopo che la placca basale si è adagiata sulla superficie cellulare e vi verificano cambiamenti conformazionali sia nella placca che nella guaina. Quest'ultima si contrae permettendo all'asse tubulare di penetrare attraverso la parete. Infine, con un meccanismo ancora sconosciuto, il DNA dalla testa, passando attraverso l'asse tubulare, entra nella cellula.



E. coli infettato da T4

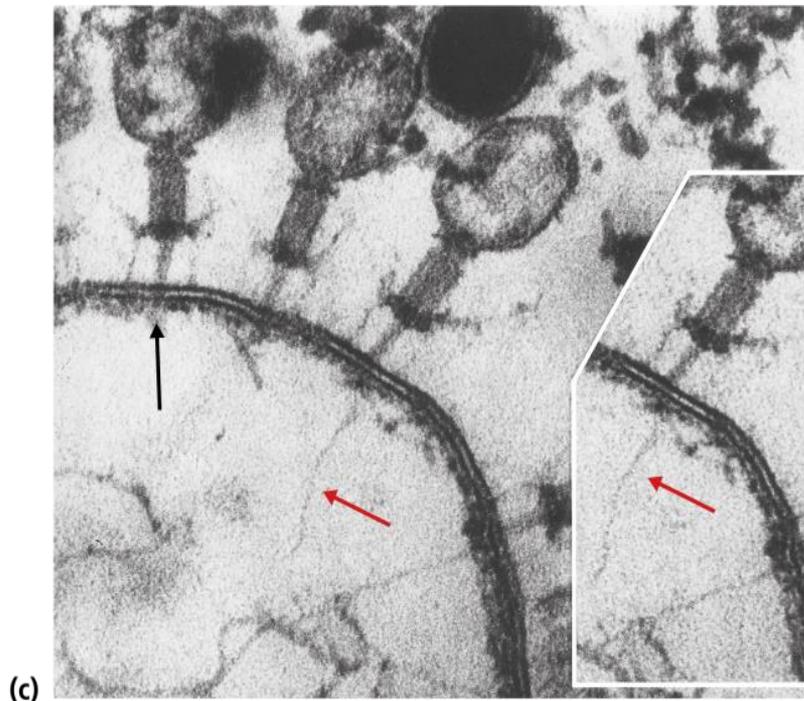


Nel caso di T4 la guaina consiste di 24 anelli formati da subunità grandi e piccole che circondano il core.

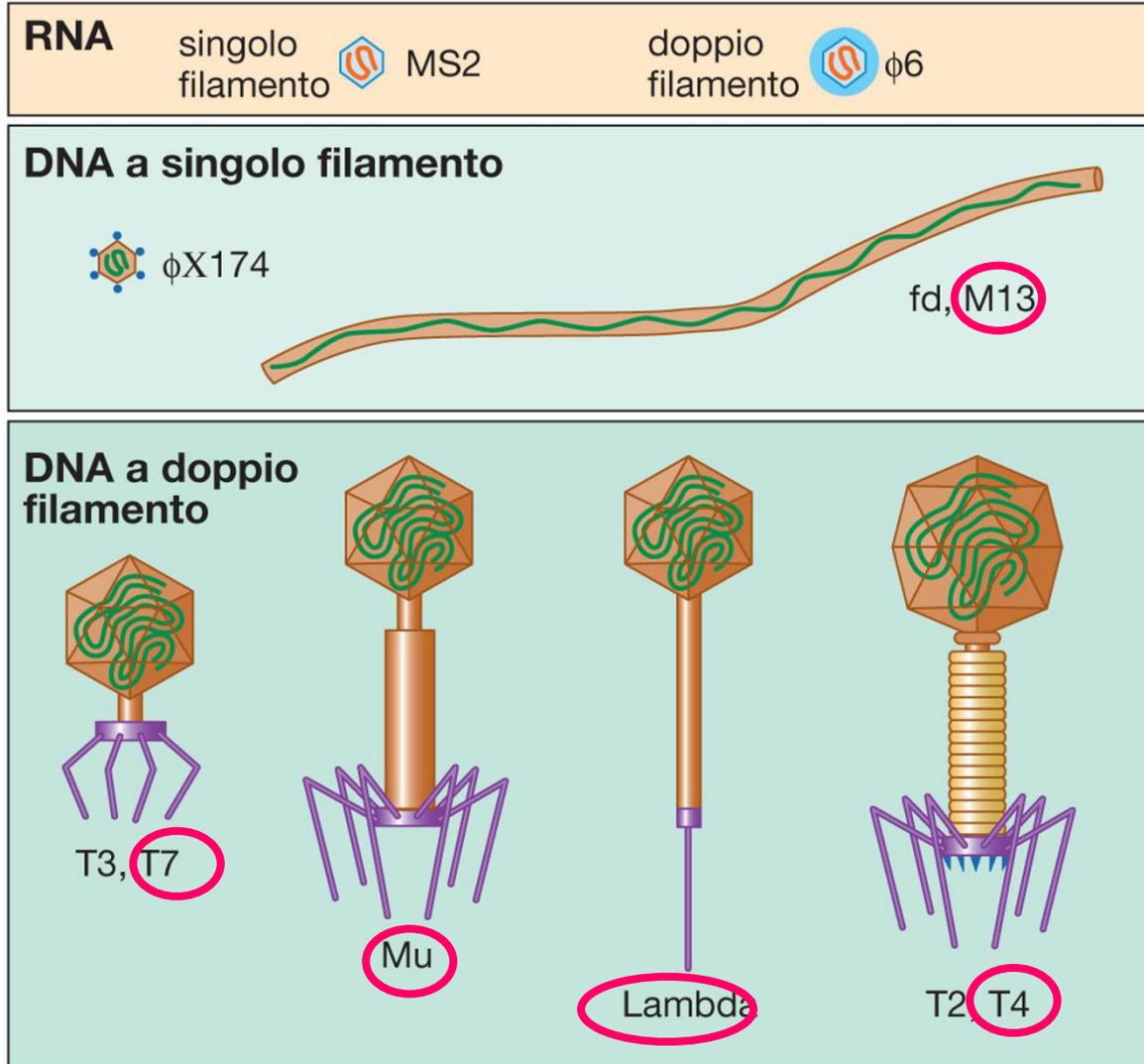
In seguito al contatto la guaina si contrae per la fusione delle sub-unità grandi e piccole per ottenere 12 anelli formati da 12 subunità. L'accorciamento della guaina spinge il core verso la parete. Questo processo è coadiuvato dal lisozima che si trova nella coda della particella.

La contrazione della testa forza il passaggio del DNA attraverso il core. Le molecole di ATP trasportate nella guaina caudale forniscono l'energia per la contrazione.

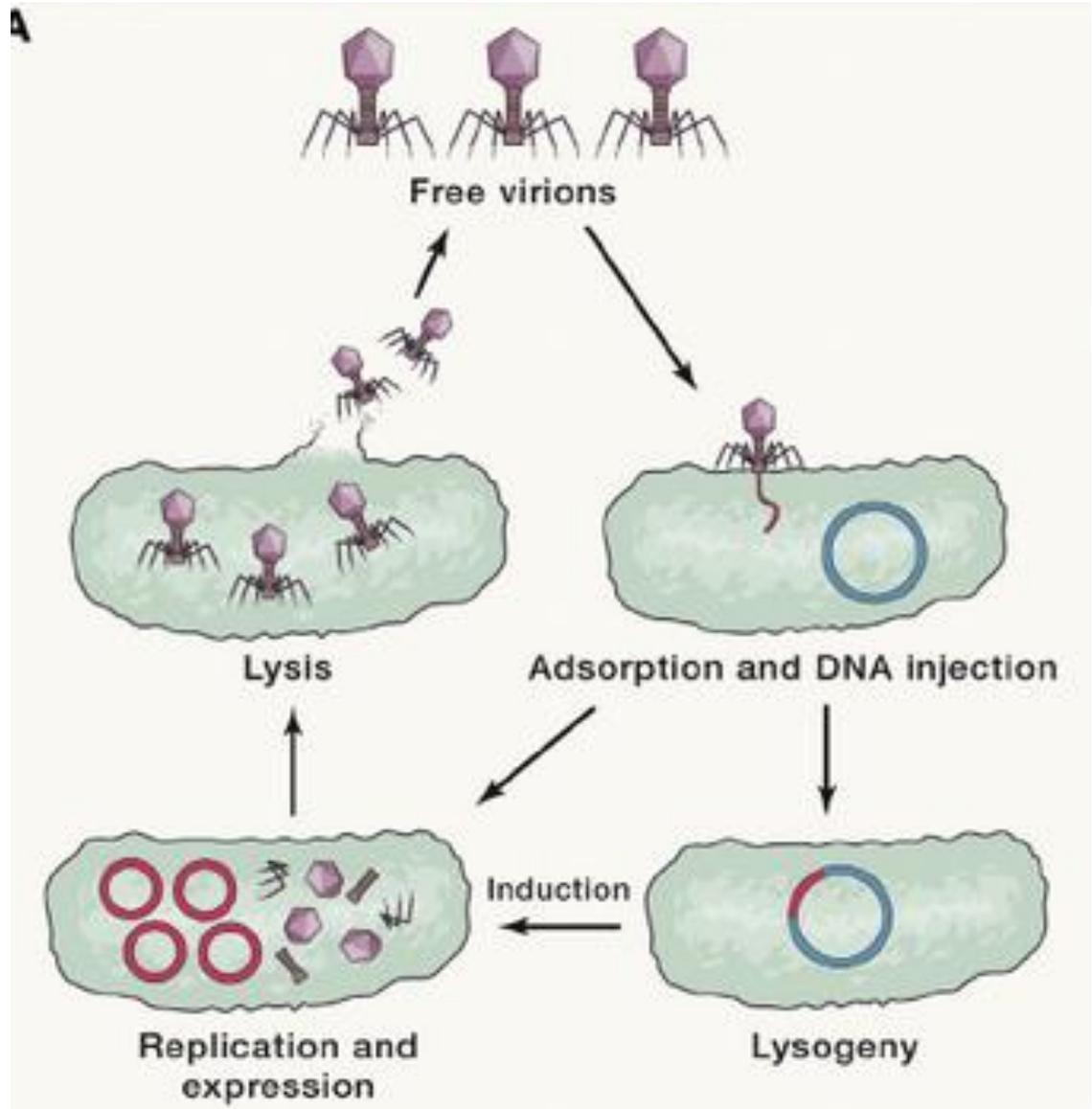
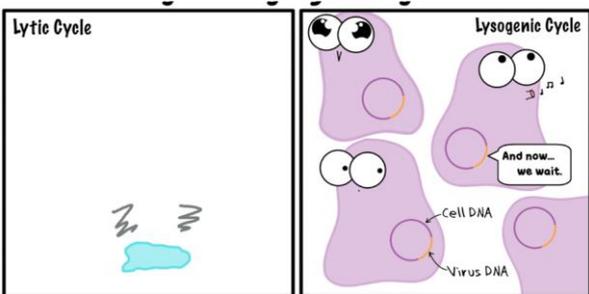
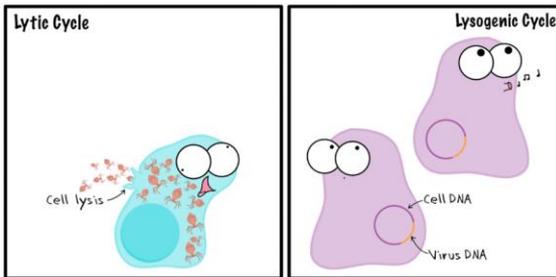
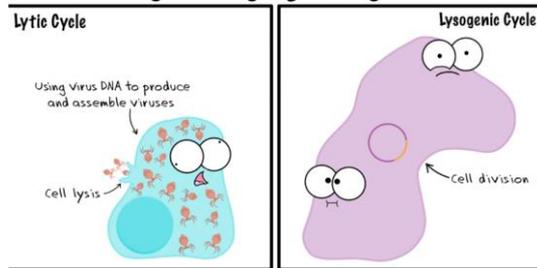
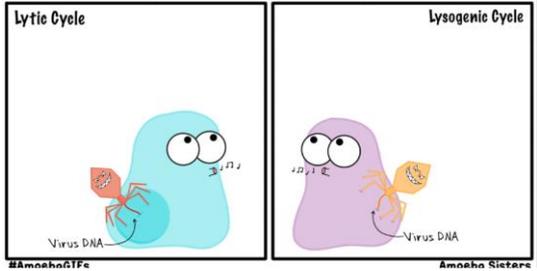
Il fago T4 riconosce la porina OmpC e il LPS come siti di adesione

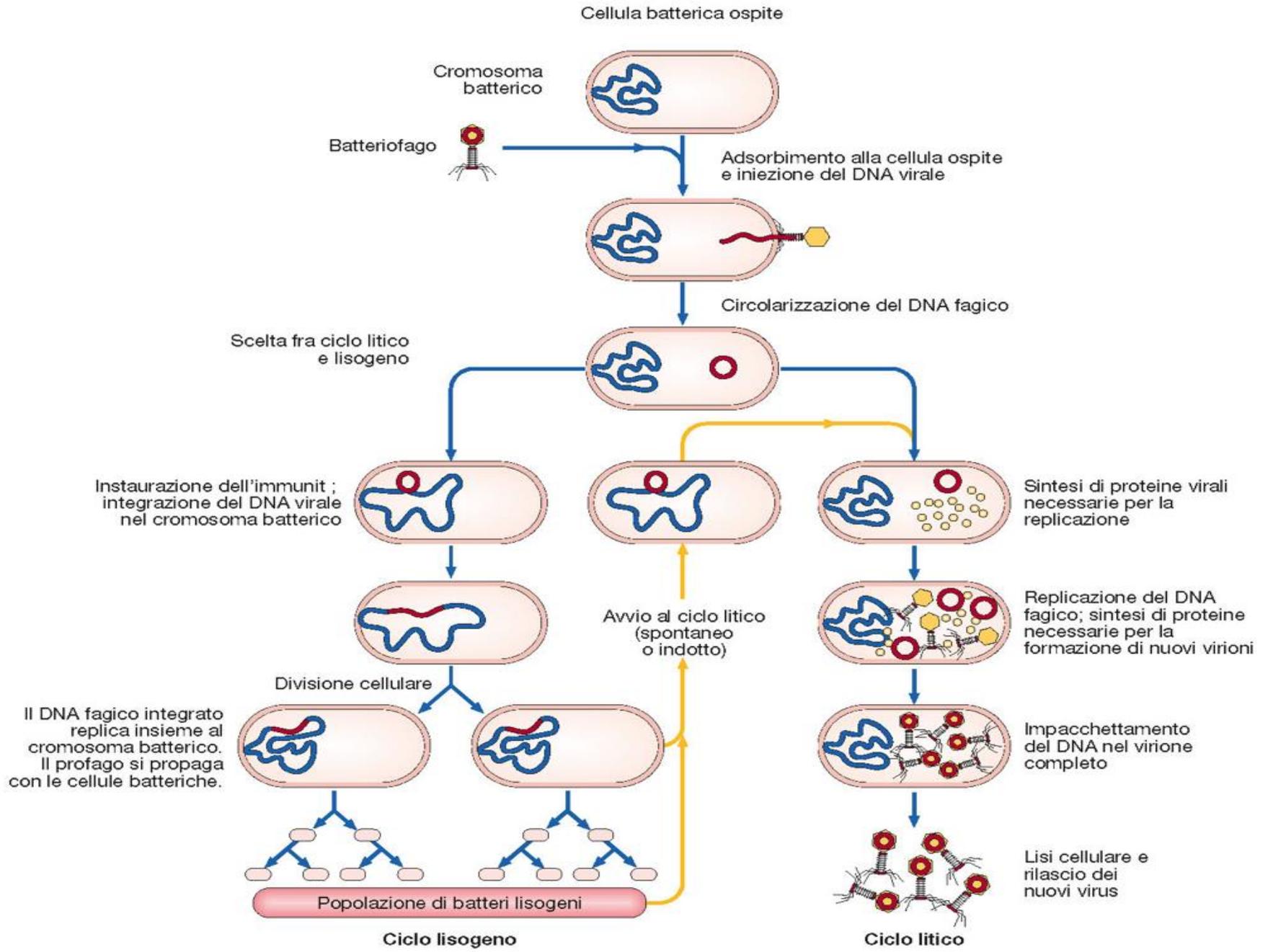


Struttura di alcuni batteriofagi modello



Lytic vs Lysogenic Cycles



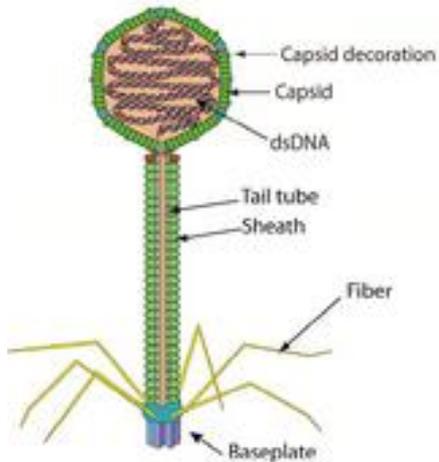


I batteriofagi virulenti : solo ciclo litico

I tre modelli : T4, T7 ed M13

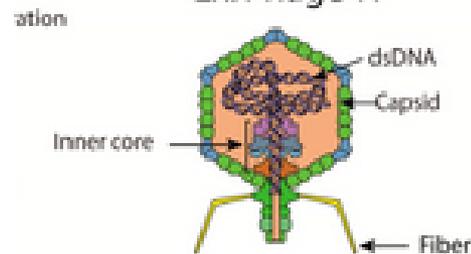
Myoviridae

Ex: Phage T4



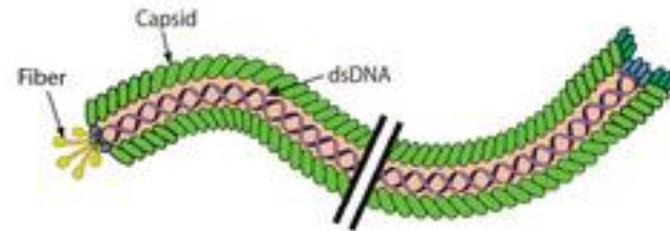
Podoviridae

Ex: Phage T7

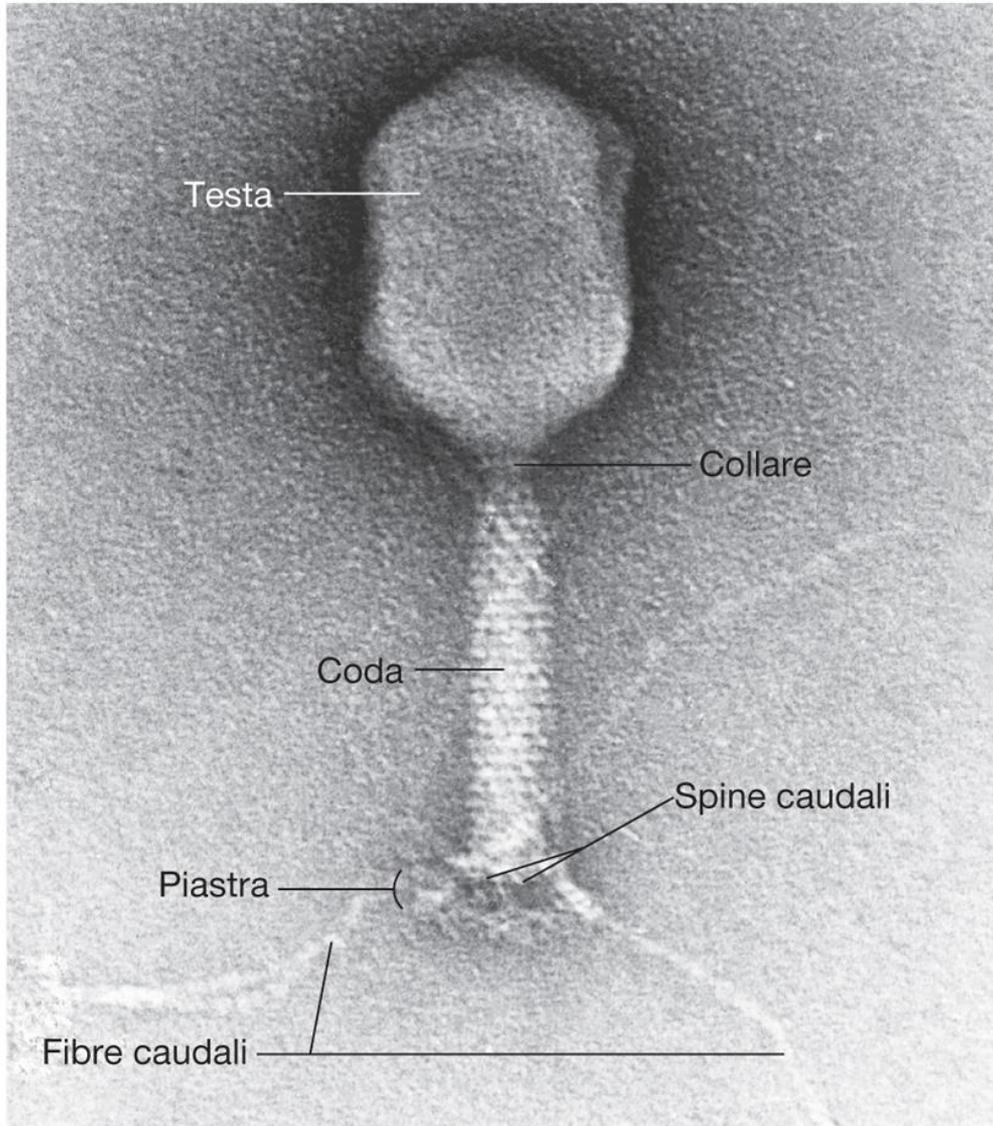


Inoviridae

Ex: Phage M13



Un batteriofago virulento : T4



Genoma di T4 costituito da una molecola di DNA a DS di 168 kb
codifica per 250 proteine e per diversi tRNA

Testa icosaedrica a cui è collegata una coda complessa costituita da un collare, una guaina e una piastra basale con lunghe fibre caudale.

Il rivestimento è costituito da oltre 25 proteine strutturali

1,3,5,7,9 → *dispari*

0,2,4,6,8 → *pari*

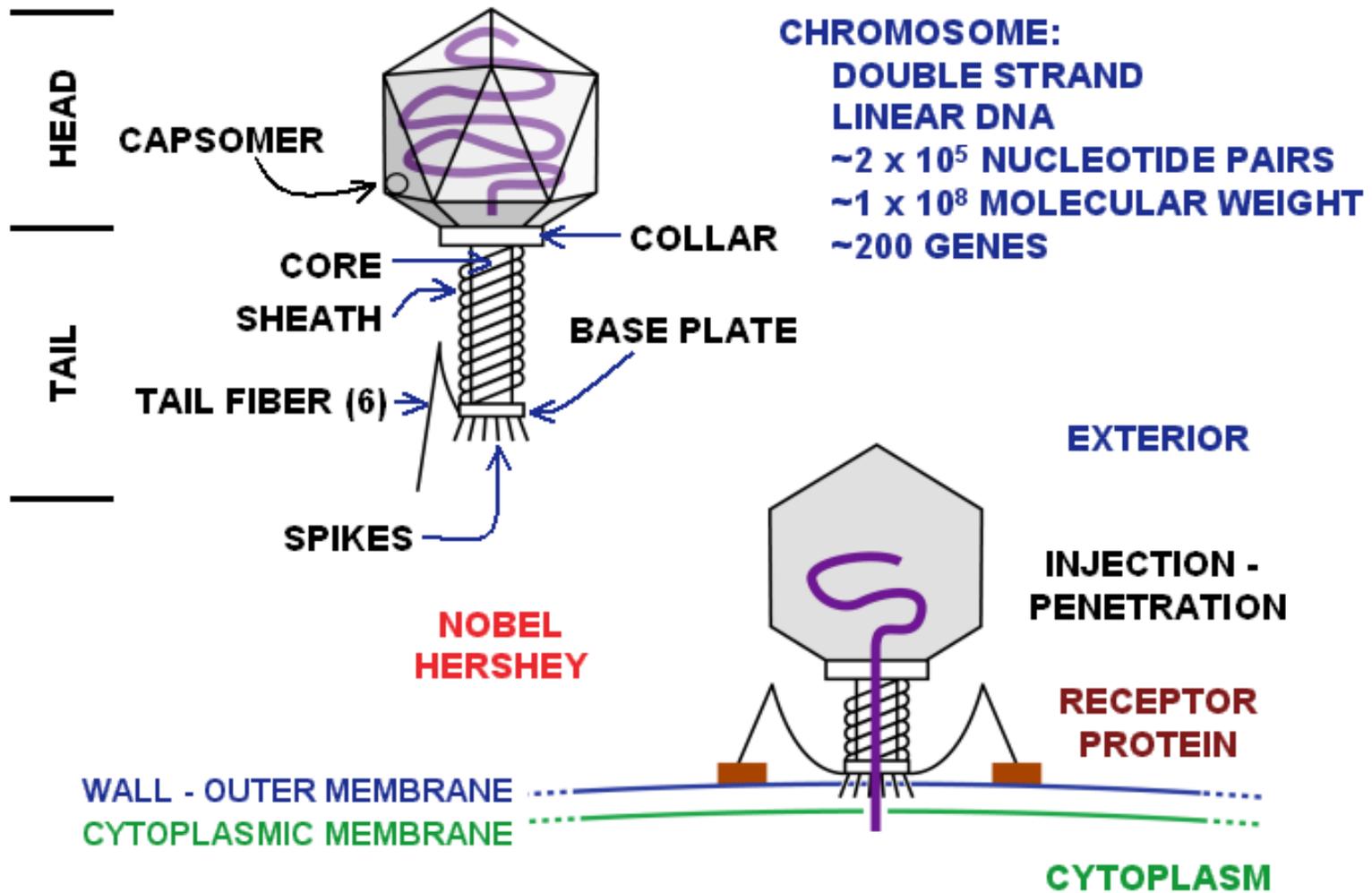
I fagi T da T1 a T7

PARI: I fagi T pari T2, T4 , T6 **virulenti autonomi** contengono idrossimetilcitosina ,non hanno bisogno dell'integrità genomica e bloccano il metabolismo della cellula

PARI/DISPARI : Il fago T5 simile ai T pari ma con citosina

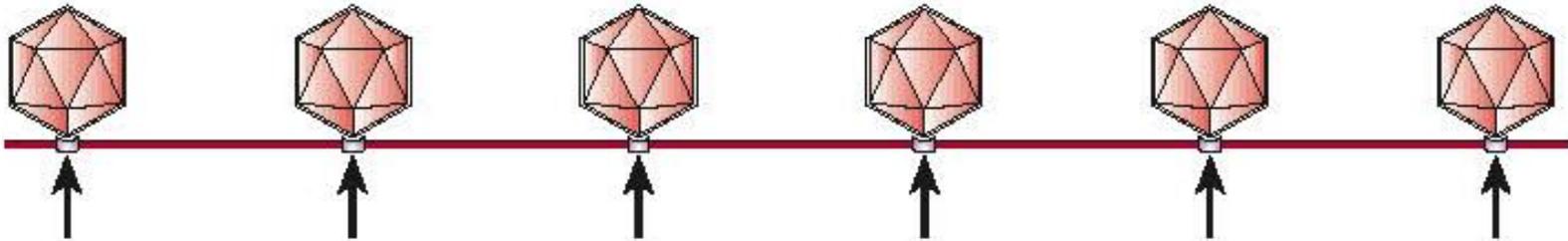
DISPARI : Fagi T3 e T7(simili) e T1: **virulenti dipendenti** contengono citosina, non bloccano il metabolismo e richiedono in parte il funzionamento delle funzioni cellulari e integrità cromosomica

PHAGE T4

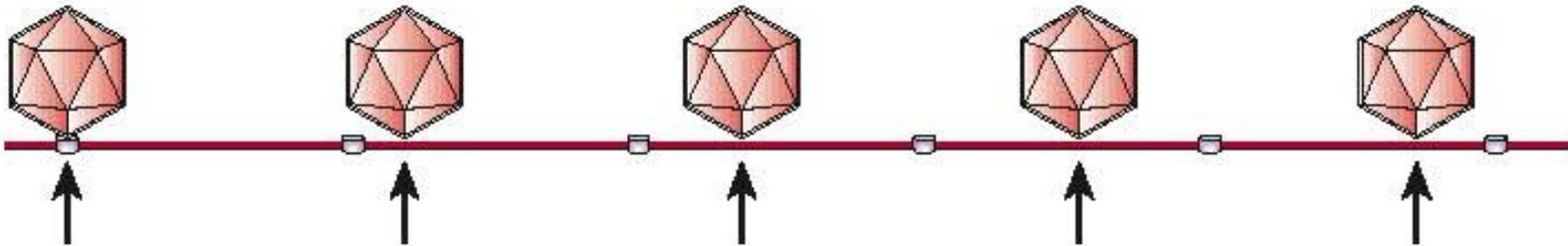


Modalità di impacchettamento del DNA

Estremità fisse



Quantità di DNA fissa



Assemblaggio delle particelle fagiche

L'impacchettamento avviene secondo il meccanismo detto "a testa piena" a partire dai concatenameri sintetizzati.

Quando il volume della testa è totalmente riempito il concatenamero viene tagliato.

In questo modo entra il 102% del genoma virale.

Questo processo è responsabile della ridondanza terminale e della permutazione circolare del genoma di T4

La permutazione circolare del genoma di T4

ABC-----UVZAB CDE----- VZABCD EF----- DEF GHIL



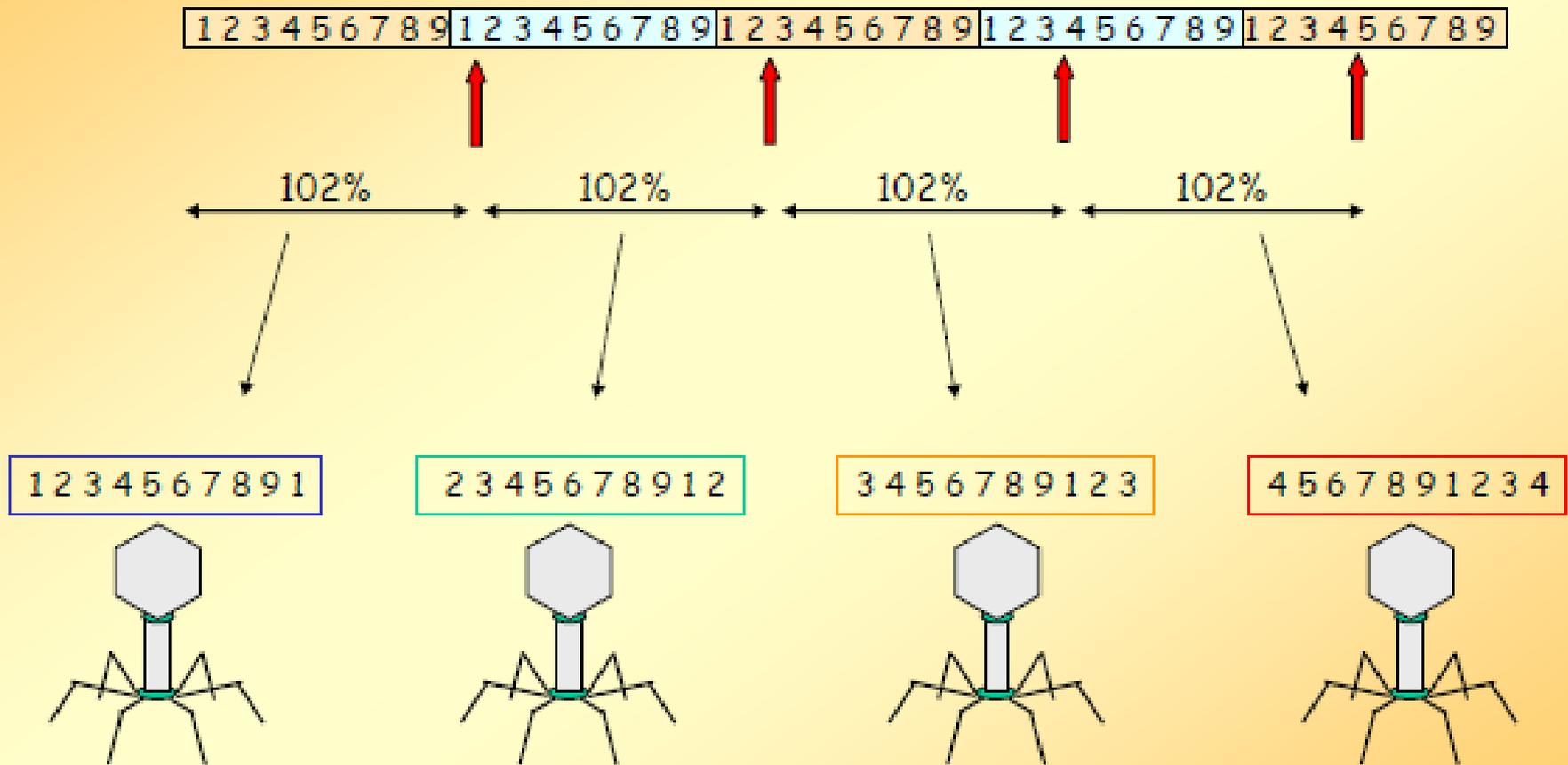
ABCD.....VZAB

CDEF.....ABCD

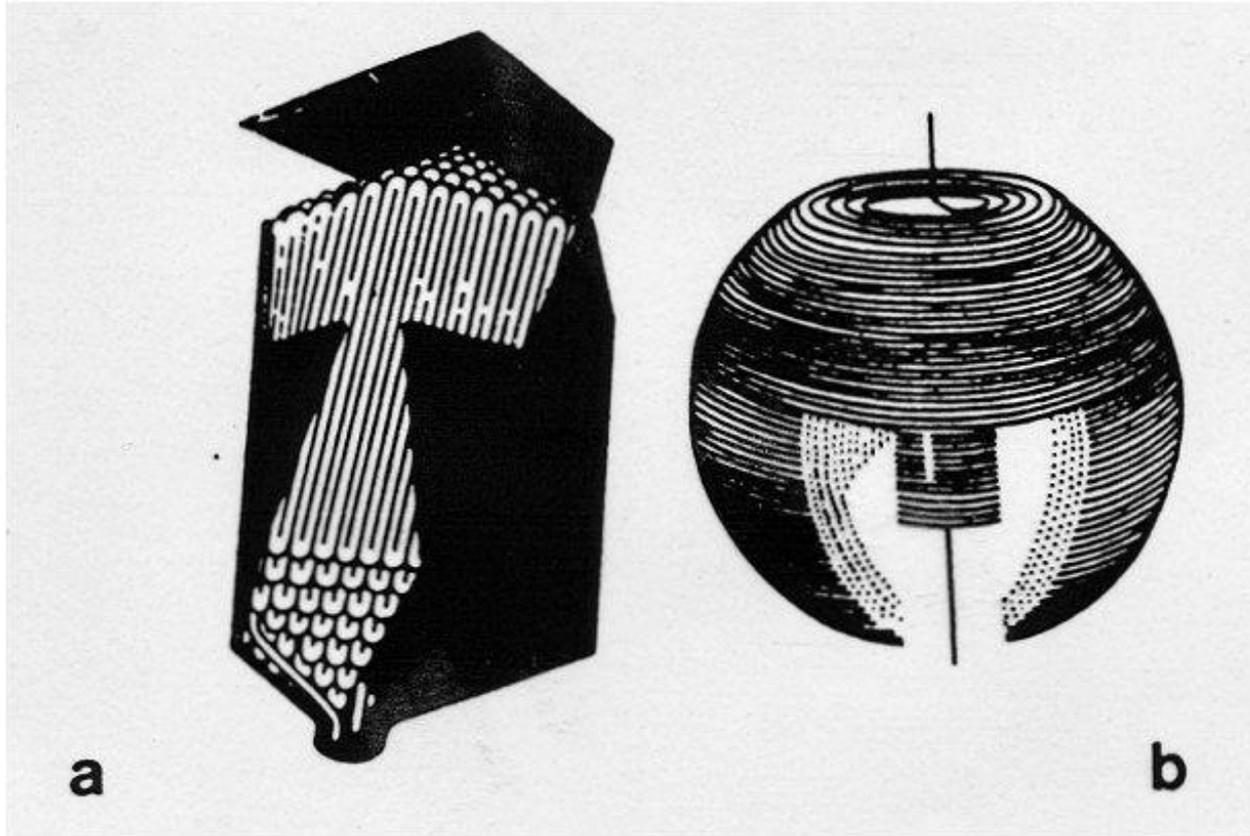
EFGHI.....DEF

Ogni virione contiene un genoma completo più una porzione ripetuta che sarà diversa da virione a virione. La porzione ripetuta servirà come regione di omologia per la circolarizzazione del fago nel nuovo ospite

Ridondanza terminale e permutazione circolare del genoma di T4



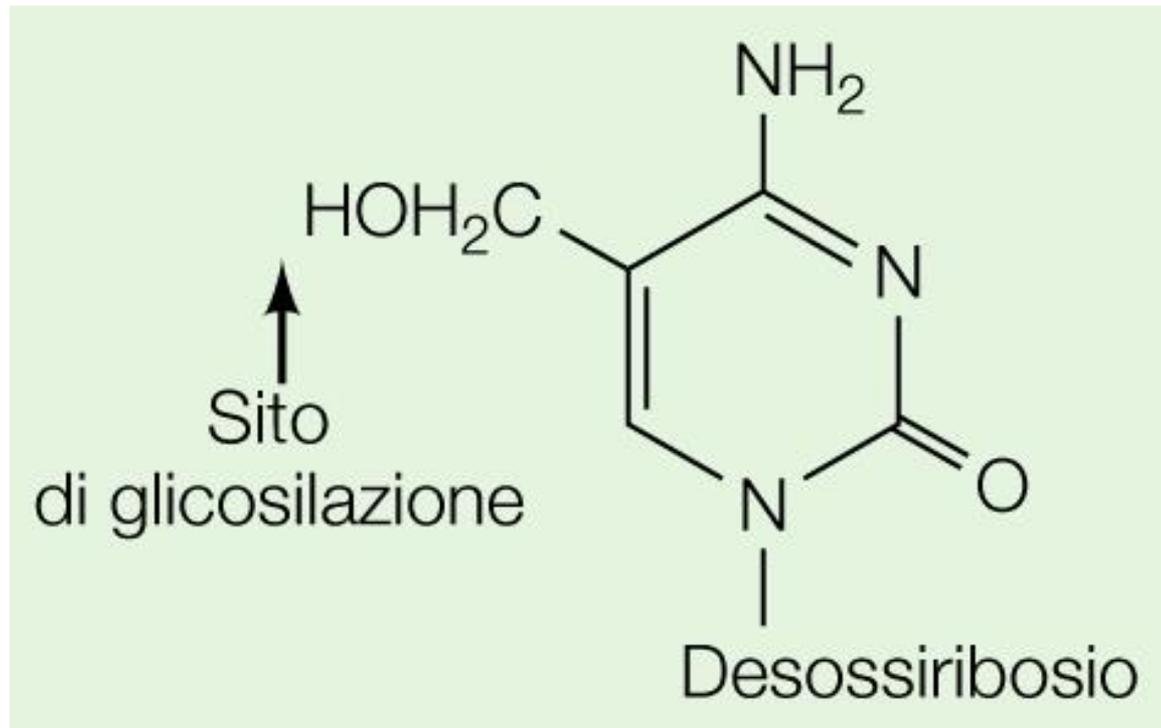
Meccanismo di riempimento del capsid fagico tramite TESTA PIENA



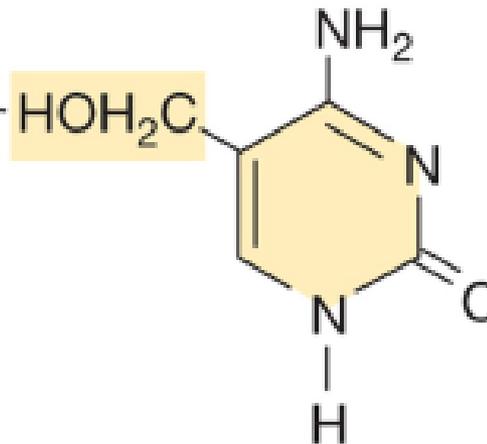
Il DNA del fago T4 è modificato e contiene una base insolita

5- idrossi metil citosina che sostituisce la citosina

Inoltre i gruppi ossidrilici di questa base vengono successivamente glicosilati rendendo così il genoma di T4 insensibile agli enzimi di restrizione



Sito di
glucosilazione



La sintesi del DNA di T4 richiede una notevole preparazione perché contiene **idrossimetilcitosina** al posto della citosina, che successivamente viene anche glucosilata. Questi residui glucosilati proteggono il DNA di T4 dall'attacco di alcune endonucleasi di *E. coli*, dette anche **enzimi di restrizione**, che altrimenti distruggerebbero il DNA virale effettuando tagli in siti specifici.

Questo meccanismo di difesa batterica è detto **restrizione**.

Il DNA batterico è protetto dall'azione di questi enzimi grazie alla presenza di **enzimi di modificazione** che effettuano modificazioni nei siti specifici riconosciuti dagli enzimi di restrizione

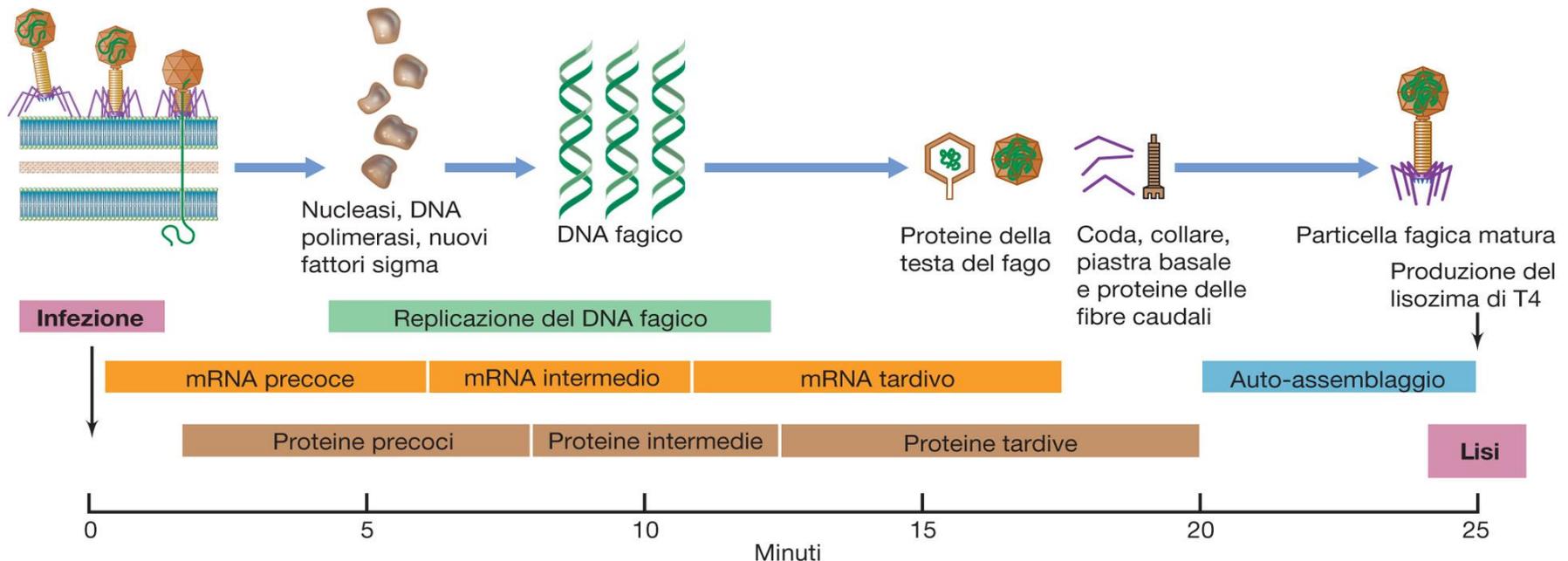
Il ciclo del fago T4: un ciclo molto veloce

Un minuto dopo la penetrazione dell'acido nucleico la sintesi dell'RNA e DNA dell'ospite cessano

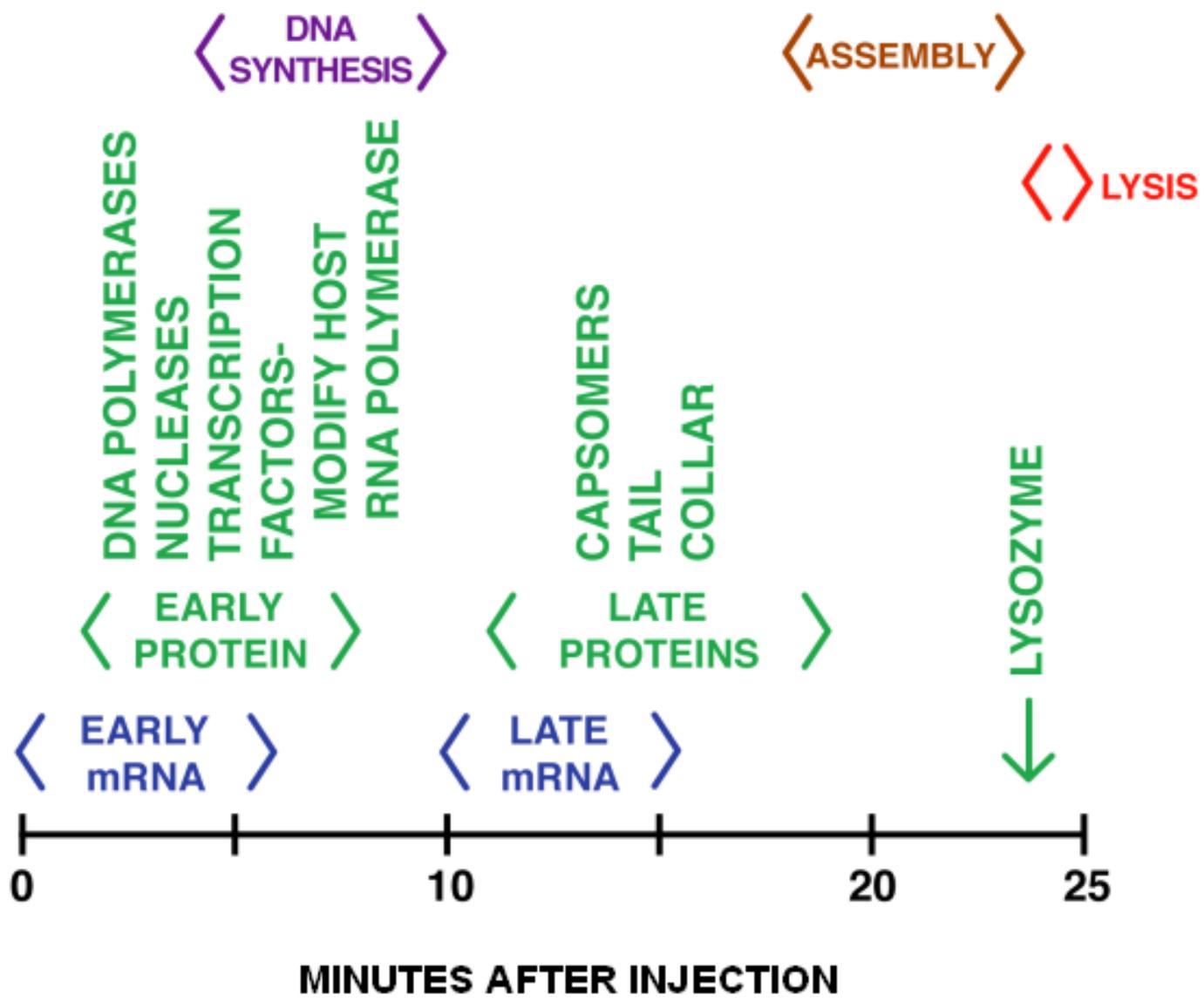
- inizia la trascrizione dei geni fagici e dopo 4 minuti si ha traduzione delle prime proteine fagiche.

I geni di T4 possono essere suddivisi in 3 gruppi :

- geni precoci
- geni intermedi
- geni tardivi



T4 GROWTH



Regolazione dell'espressione dei geni fagici

I geni con funzioni correlate sono generalmente raggruppati per essere espressi contemporaneamente in un preciso istante del ciclo di replicazione

I geni introdotti nella cellula ospite vengono espressi secondo una ordinata sequenza temporale che consente una efficiente coordinazione degli eventi che portano alla produzione della progenie virale

Geni **precoci immediati**: trascritti subito dopo l'ingresso, codificano per prodotti che partecipano alla replicazione del DNA virale e che bloccano le attività del batterio. La loro trascrizione si arresta nel giro di pochi minuti.

Geni **intermedi o precoci ritardati**: partecipano alla replicazione e alla ricombinazione del DNA. Possono essere trascritti per l'intero ciclo replicativo

Geni **tardivi**: codificano per proteine capsidiche, fattori che partecipano all'assemblaggio e proteine litiche

Il passaggio da una fase all'altra è geneticamente controllato attraverso la sintesi di nuova RNA polimerasi (T7) o fattori che alterano la specificità della RNA polimerasi batterica

T4 **non codifica** per una propria RNA polimerasi ma **modifica sequenzialmente la polimerasi dell'ospite.**

Geni precoci: I promotori precoci sono trascritti dalla RNA polimerasi dell'ospite. Tra i geni precoci:

- proteine in grado di modificare la RNA polimerasi (ADP ribosilazione della subunità α della RNA pol.)
- fattore anti-sigma70 che blocca il fattore sigma70 necessario per la trascrizione dei geni dell'ospite
- proteine che si legano alla RNA pol. cambiandone la specificità, la proteina regolatrice MotA.

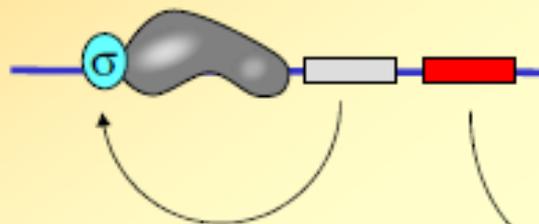
• **Geni intermedi.** Trascritti dalla RNA pol. modificata a cui è legata la proteina MotA che conferisce la capacità di riconoscere i promotori dei geni intermedi

• **Geni tardivi** sono trascritti grazie alla sintesi di un nuovo fattore sigma T4 specifico

Regolazione della trascrizione in T4

Il controllo della trascrizione in T4 coinvolge la sintesi di proteine che modificano la specificità della RNA polimerasi dell'ospite in modo da farle riconoscere i diversi promotori fagici. I promotori precoci immediati sono letti direttamente dall'RNA polimerasi attraverso il fattore sigma dell'ospite

geni precoci immediati



blocca il fattore sigma

Una delle proteine precoci immediate ha la funzione di bloccare il fattore sigma e quando raggiunge una certa concentrazione, i geni precoci immediati sono bloccati

geni precoci ritardati



fattori che modificano l'RNA polimerasi



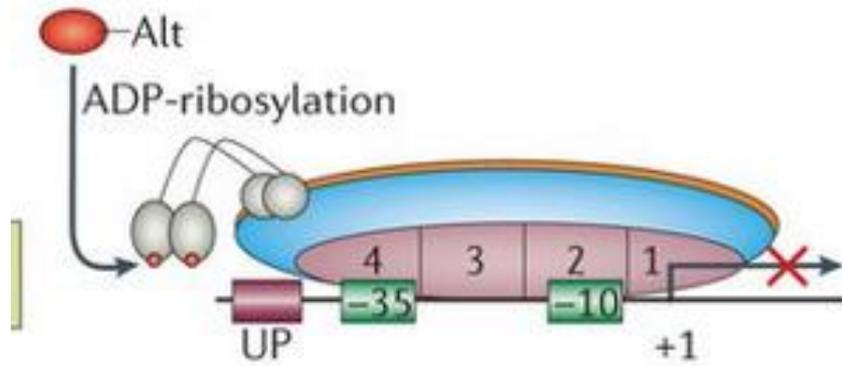
La modificazione della RNA polimerasi

2 geni precoci *mod* e *alt* codificano per proteine che ADP ribosilano la RNA polimerasi dell'ospite.

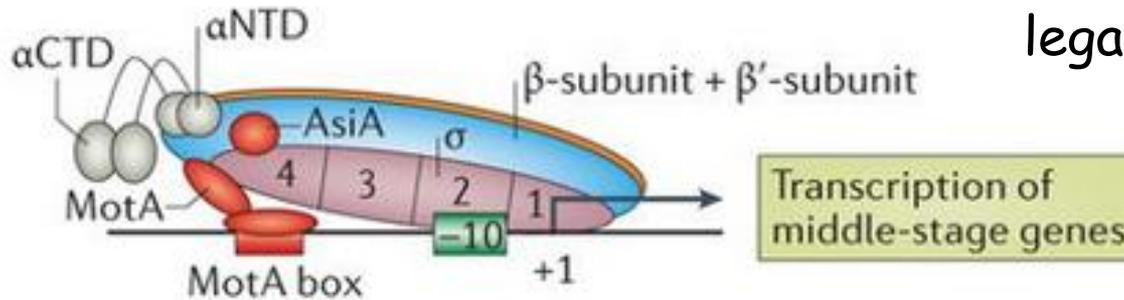
La proteina Alt è presente nel capsid e ed è iniettata assieme al DNA contribuendo immediatamente allo spostamento della specificità della RNA polimerasi verso i geni fagici

Altre proteine codificate dai geni precoci inibiscono il fattore sigma 70 dell'ospite (*AsiA*)

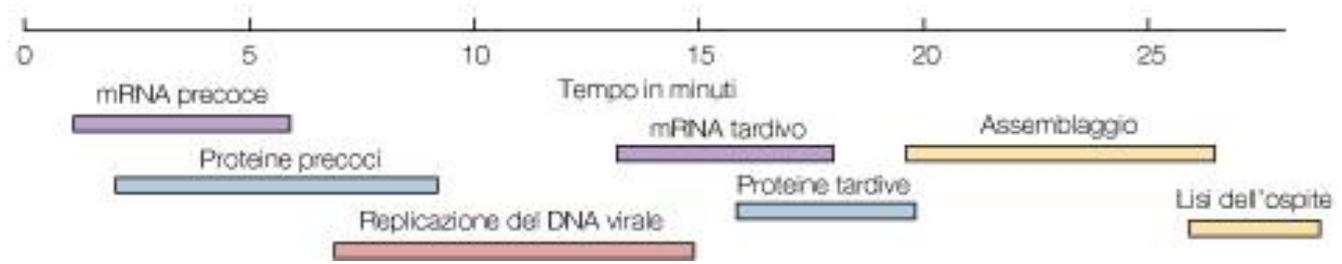
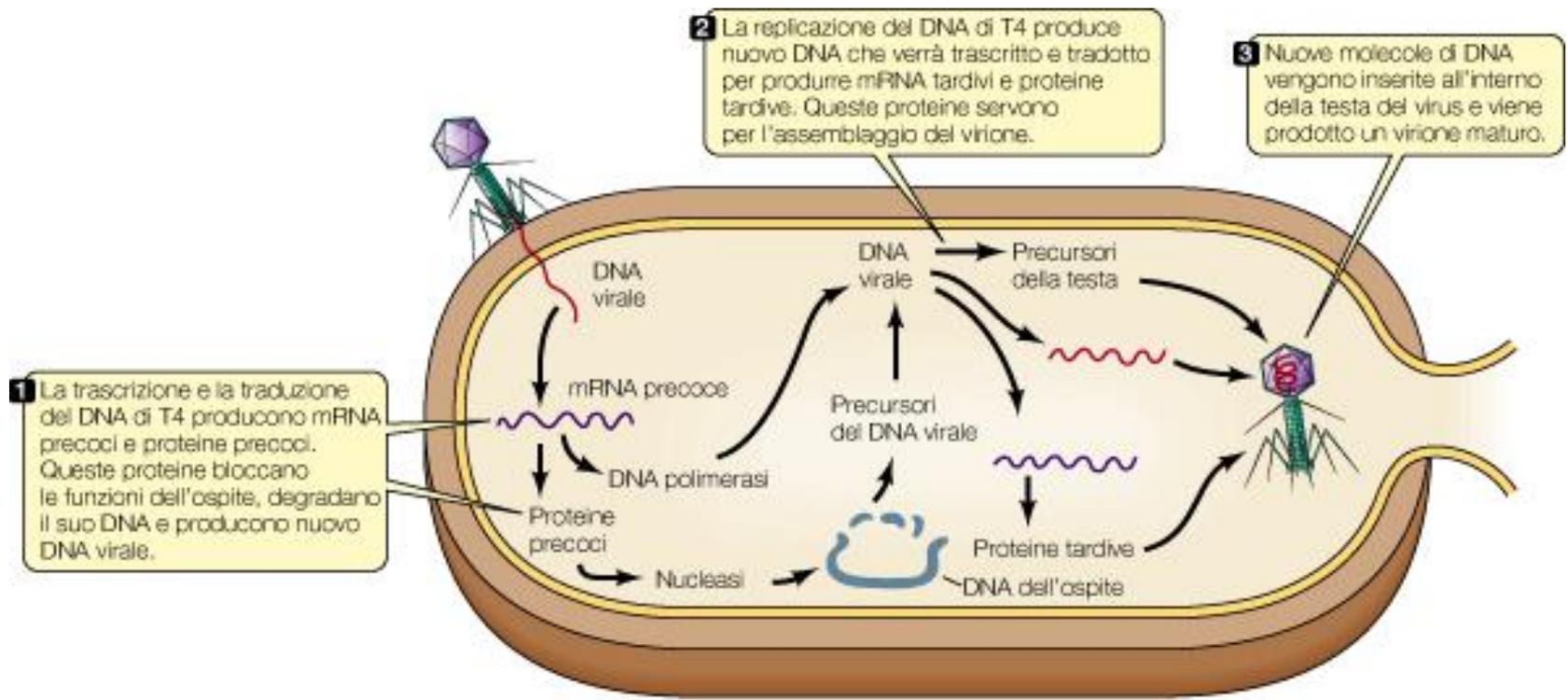
La degradazione del DNA spegne definitivamente la trascrizione dei geni dell'ospite



Proteine fagiche come la proteina Alt provocano la ADP ribosilazione della subunità alfa della Rna Pol.



Proteine fagiche come AsiA disattivano $\sigma 70$ e facilitano il legame di MotA



Nelle fasi precoci T4 sintetizza :

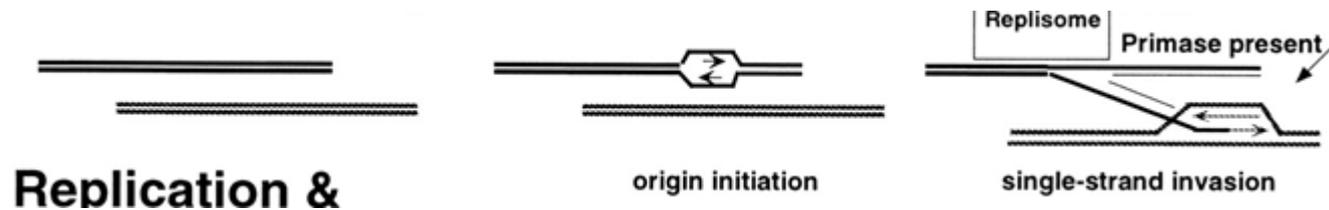
- enzimi per la sintesi e glicosilazione della 5 idrossimetil citosina
- enzima deputato alla degradazione del precursore della citosina
- enzima coinvolto nella replicazione del DNA fagico
- enzimi coinvolti nel processamento del DNA

Geni tardivi comprendono geni che codificano:
proteine strutturali della testa e della coda
il lisozima di T4

In un ciclo di 23 minuti vengono rilasciate
100 nuove particelle virali.

La replicazione di T4

2 diverse modalità



Presenza di siti ori che sono attivati dalla trascrizione da parte della RNA polimerasi batterica.

T4 possiede le proteine necessarie per la replicazione anche se partecipano la RNA polimerasi per l'apertura delle ori e la DNA pol I dell'ospite che sintetizza i frammenti di Okazaki .

Questa prima modalità viene disattivata quando sono attivati i prodotti dei geni tardivi e si assiste ad un processo di replicazione strettamente connesso alla ricombinazione formando una fitta di rete di molecole intrecciate tra loro / ricombinazione

Conseguenze sull'ospite dell'infezione da parte di T4

In meno di 1 minuto vengono spente le sintesi delle macromolecole dell'ospite ed iniziano quelle del fago in quanto

- 1) Si ha modificazione della RNA polimerasi che non riconosce più i promotori del cromosoma
- 2) Srotolamento del nucleoide batterico che aderisce alla membrana e viene degradato
- 3) Inibizione della sintesi proteica dell'ospite

Il tasso di replicazione del DNA di T4 è 10 volte quella del DNA batterico grazie ad un numero molto elevato di forche replicative circa 60 che procedono contemporaneamente.

Le molecole neoformate ricombinano tra di loro

Il fago T4 codifica per la sintesi di un apparato di replicazione completo costituito da 7 proteine essenziali: DNA polimerasi, DNA elicasi, primasi, SSB fagiche sliding clamp e sliding clamp loader costituiscono il replisoma.

RNasi H che rimuove i primer

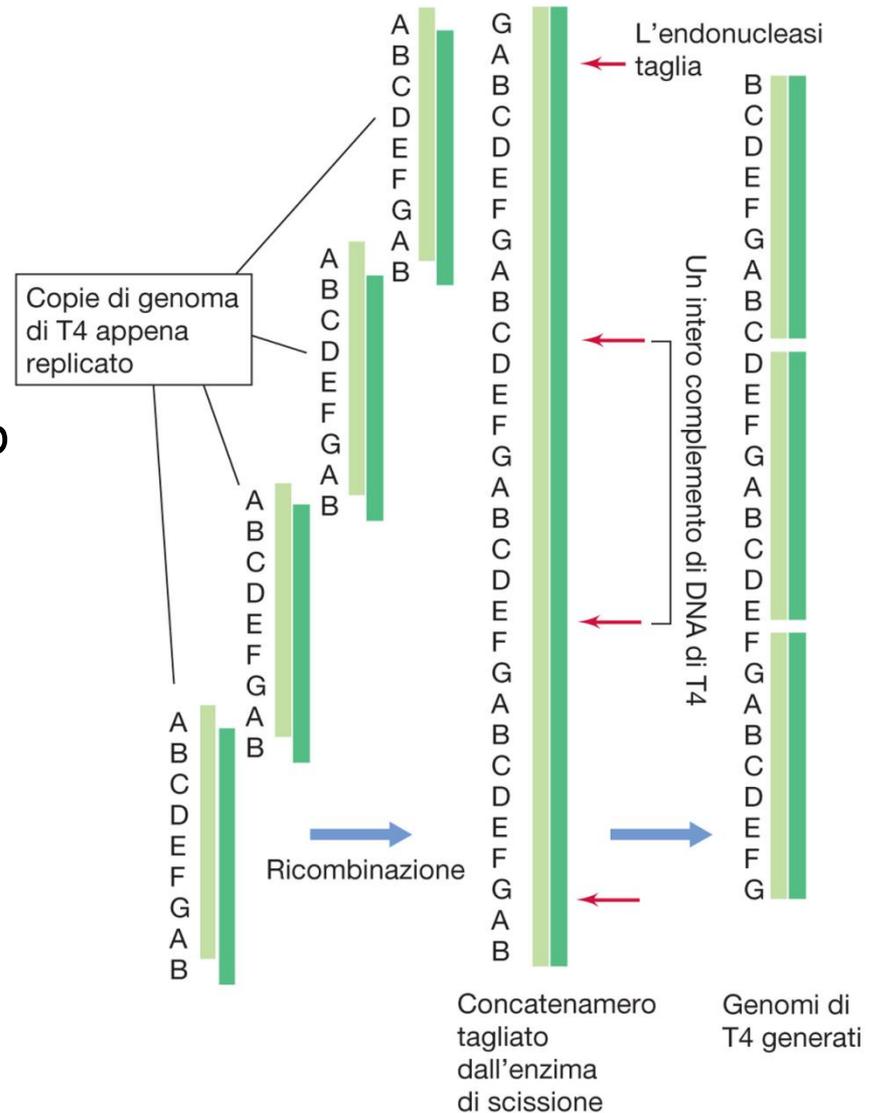
Ligasi che lega i frammenti di Okazaki

La replicazione di T4

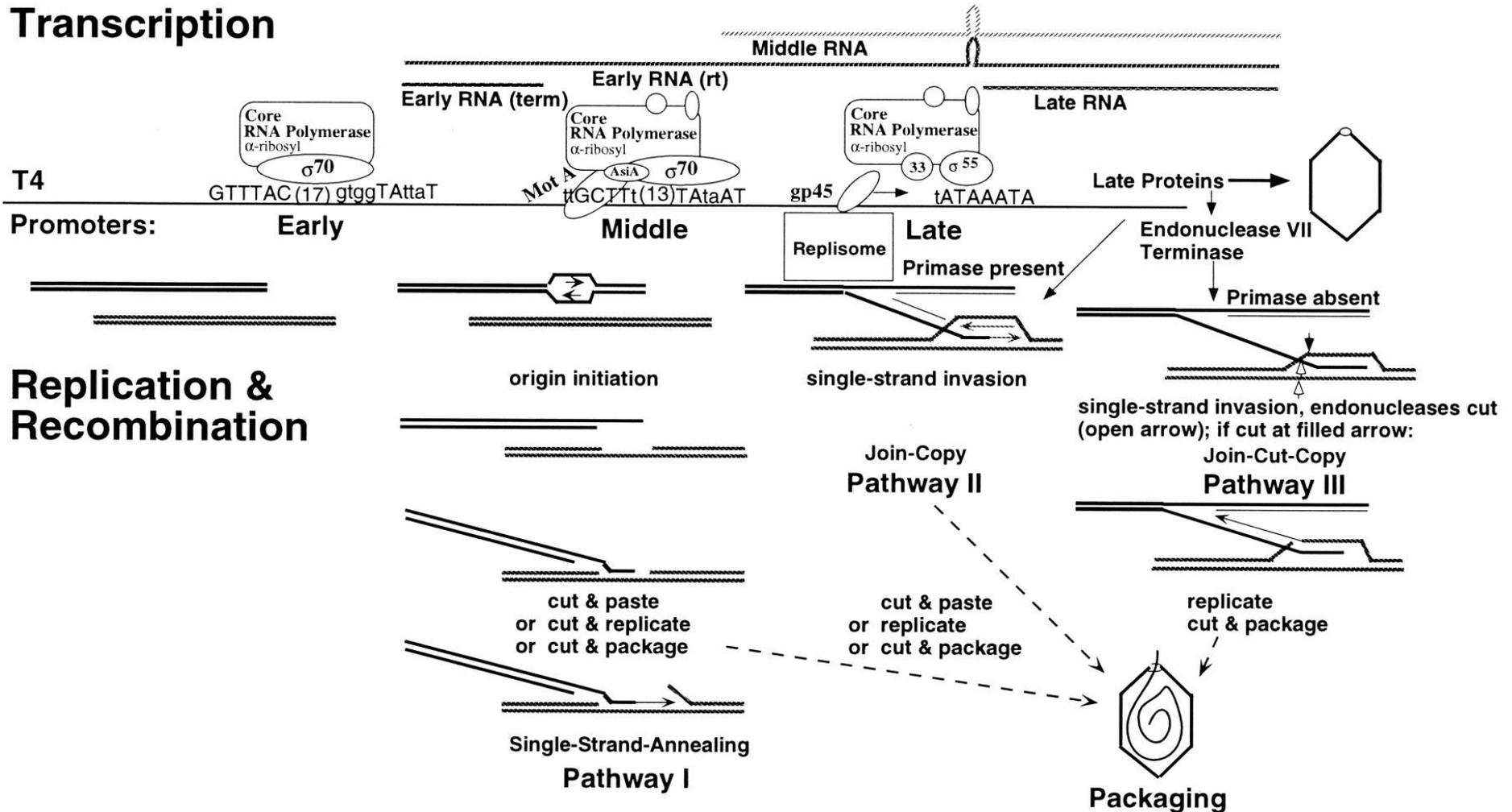
Il Dna di T4 viene replicato dapprima come singole unità con estremità ridondanti poi le diverse unità vengono unite testa-coda a formare dei lunghi concatenameri.

Un'endonucleasi taglia un frammento di DNA più lungo di un singolo genoma in modo che rimangano regioni terminali ripetute.

Il DNA del fago T4 viene impacchettato con il meccanismo della testa piena che prevede l'inserimento nel capsido della massima quantità di DNA possibile.



Transcription



La replicazione di T4 è molto complessa e coinvolge anche un intenso processo di ricombinazione

Batteriofago T7

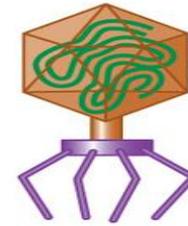
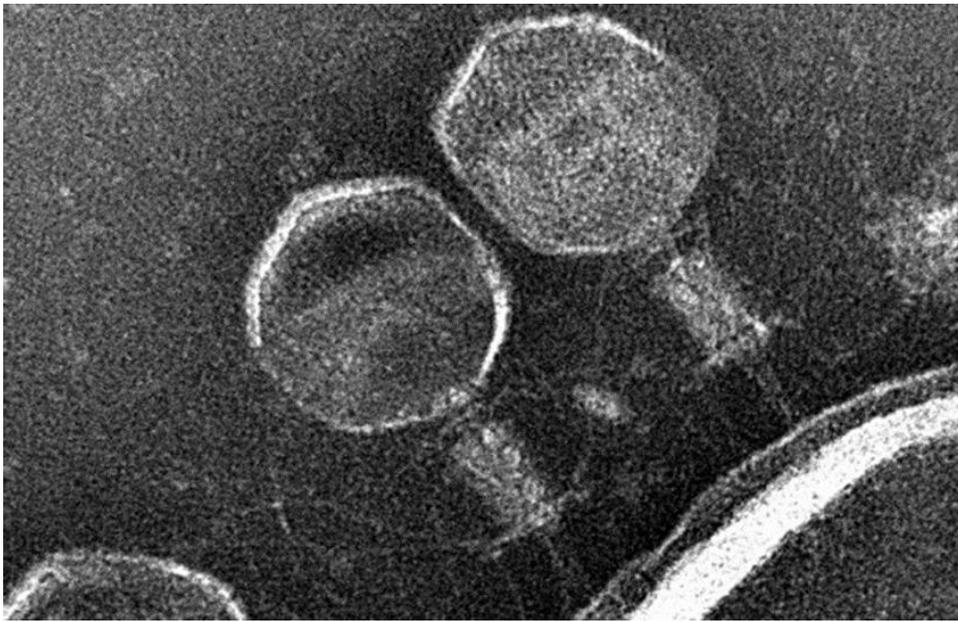
T7 (e T3) sono batteriofagi a DNA ds piccoli con testa icosaedrica e coda molto piccola

Genoma è una molecola lineare di 40 kb (92% codifica proteine)

- In T7 vi è sovrapposizione genica con traduzione con differenti schemi di lettura e reinizio interno alla traduzione
- L'ordine dei geni influenza la regolazione e la moltiplicazione virale
- Il genoma lineare anche nella testa del fago viene iniettato lentamente

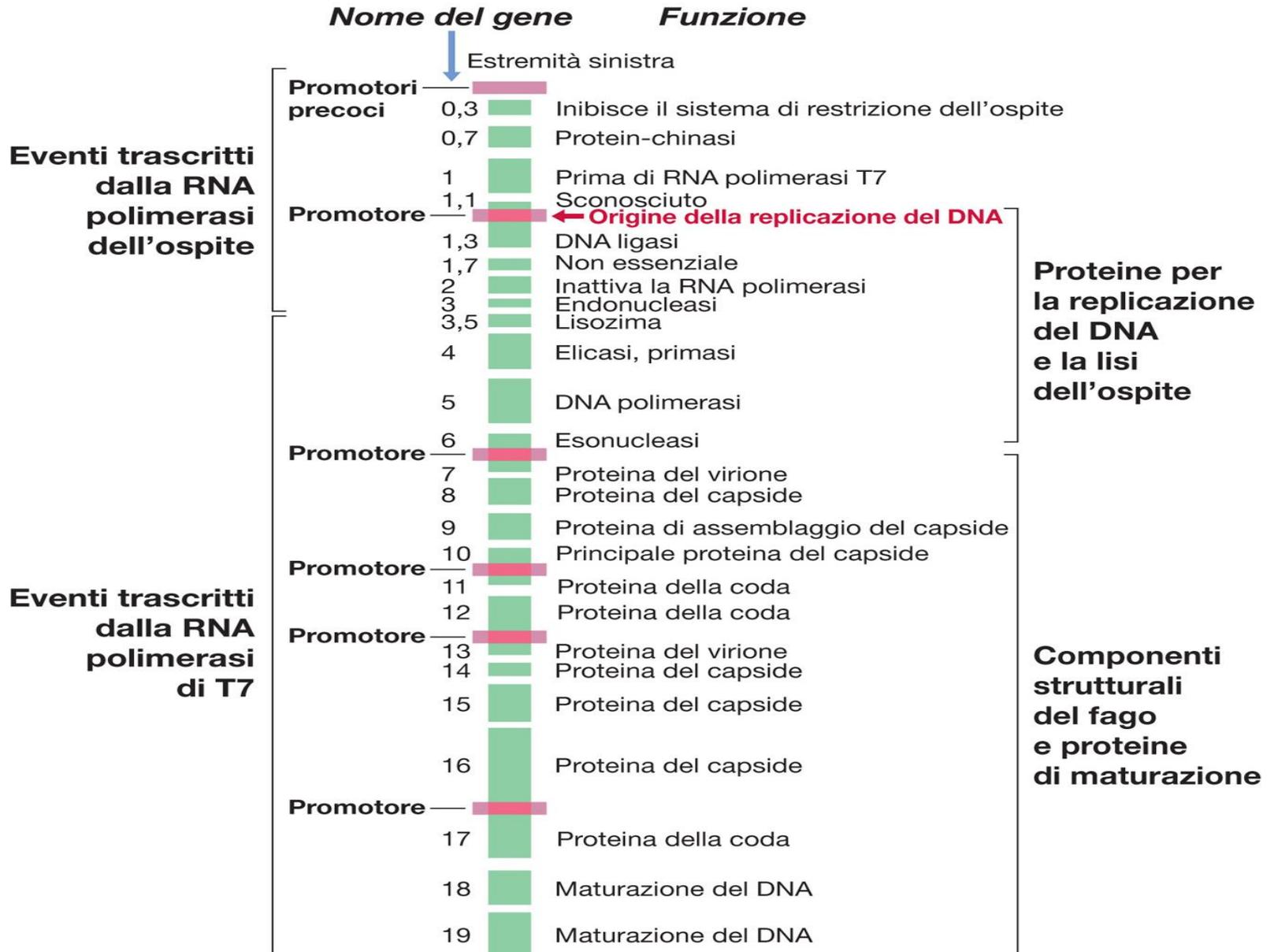
Tra i geni precoci immediati

- Proteina che inibisce il sistema di restrizione dell'ospite
- RNA polimerasi virus specifica
- Proteine che inibiscono la RNA polimerasi dell'ospite



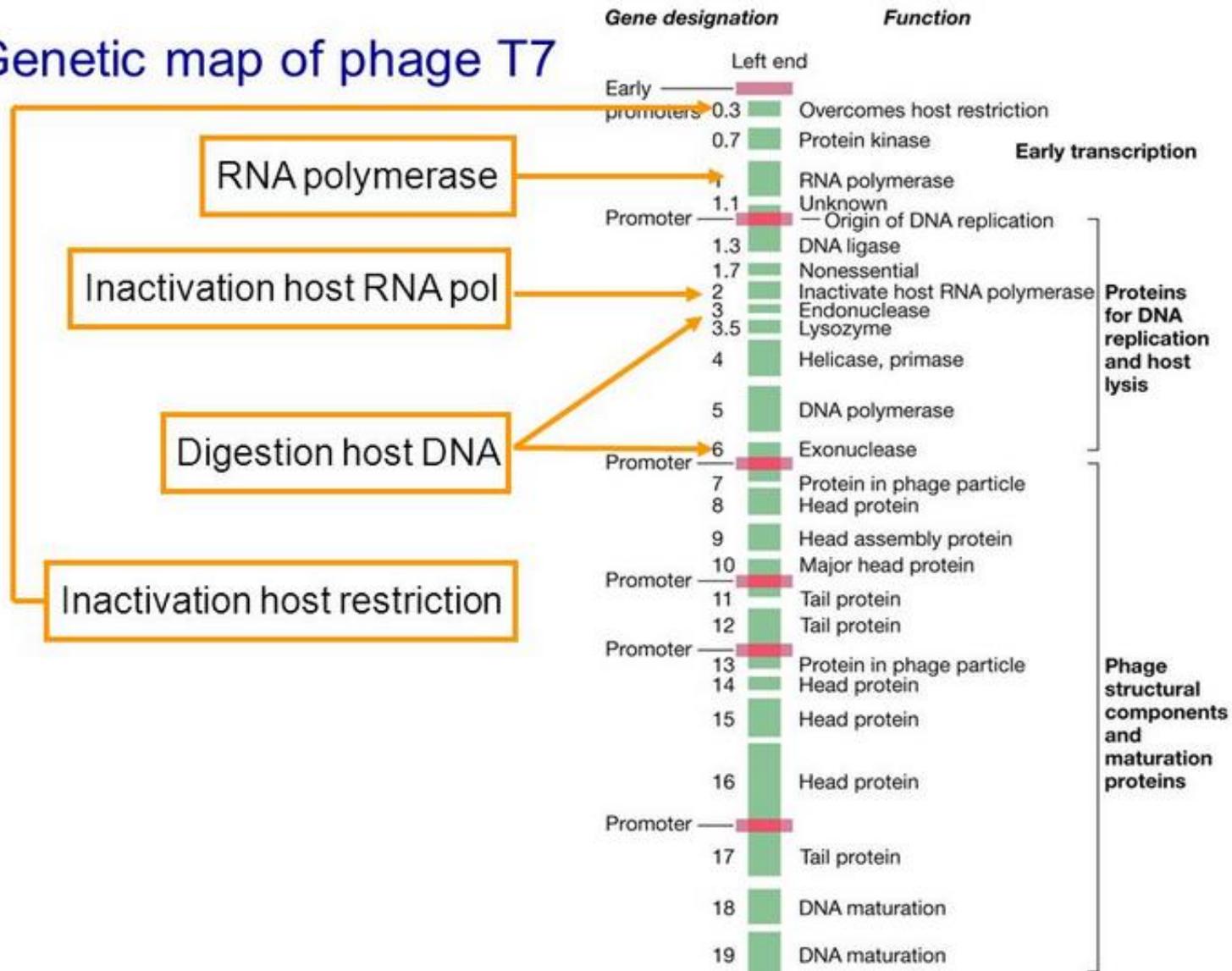
Batteriofago T7

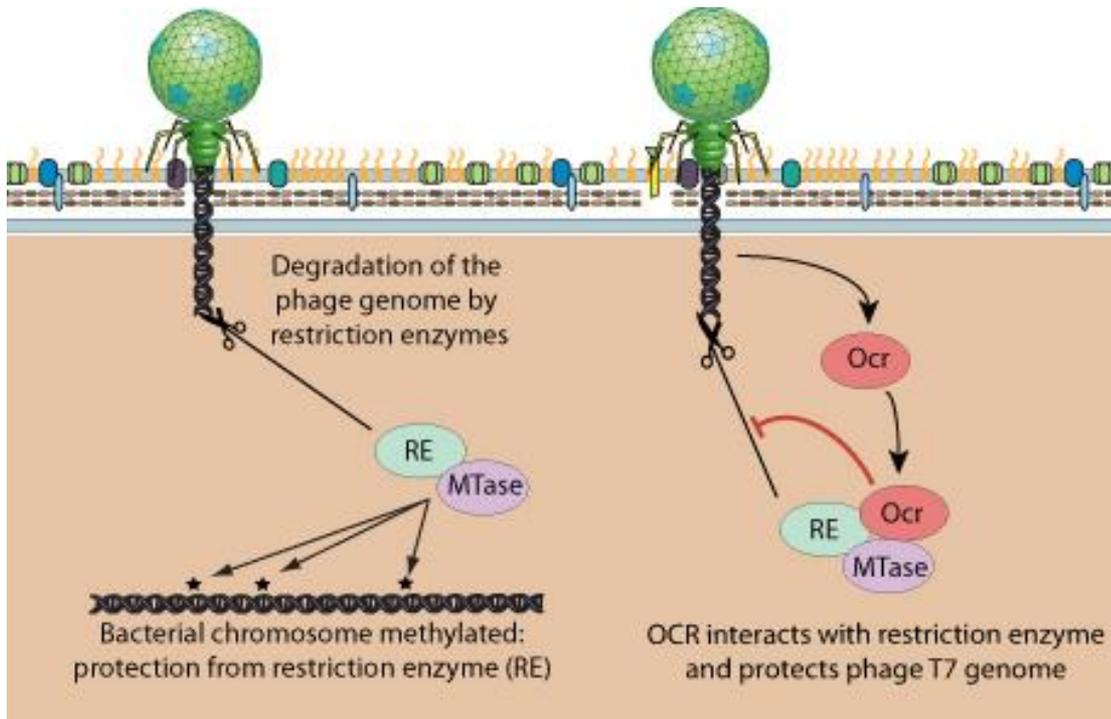
1. Il ciclo replicativo dura 25 minuti
2. Il genoma è una molecola di DNA lineare a doppio filamento di 39 737 bp
3. Il fago T7 codifica tutte le proteine necessarie per la replicazione e la trascrizione del DNA
4. Tempo necessario per produrre 100 copie di genoma del fago T7 partendo da un'unica copia: 5 minuti
5. Dimensione di scoppio (in *Escherichia coli* come ospite): 100 virioni/cellula



Eventi importanti nella strategia di T7

Genetic map of phage T7

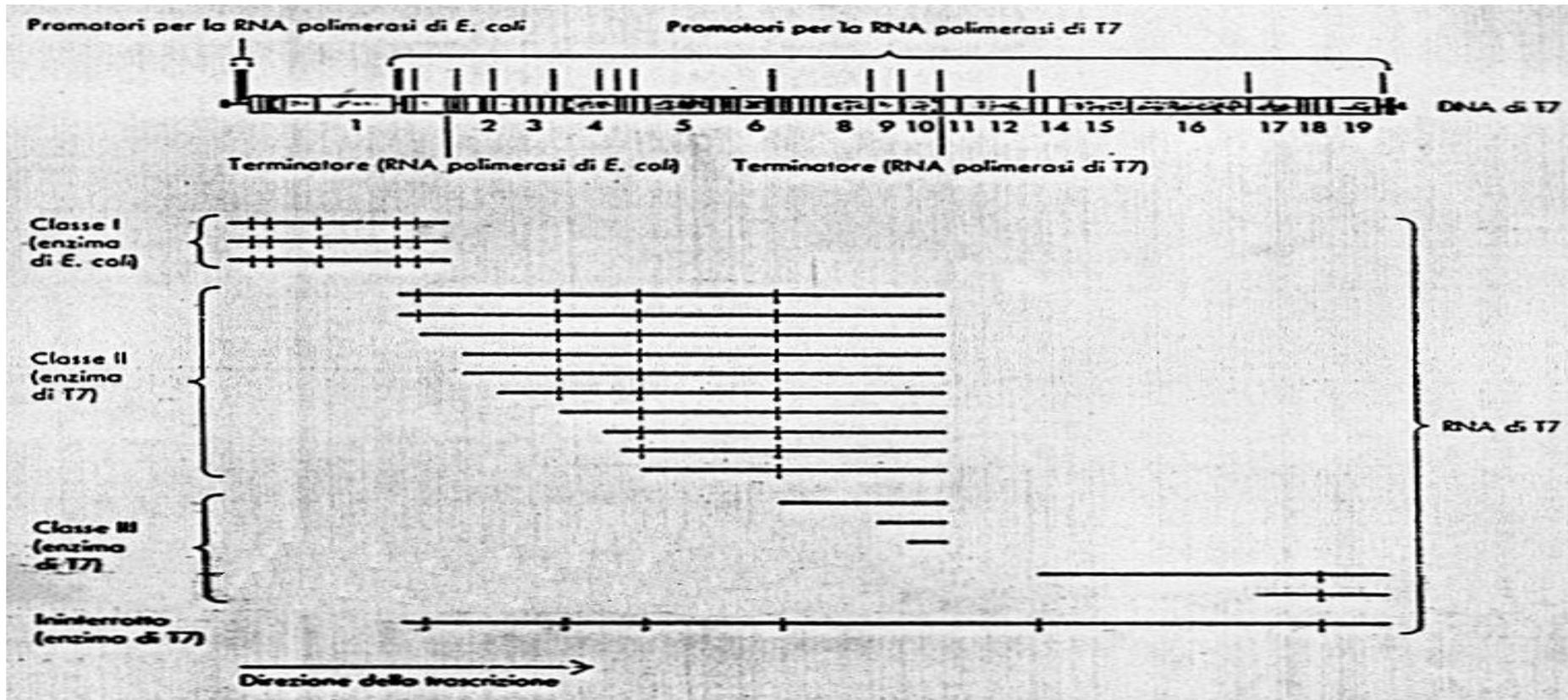


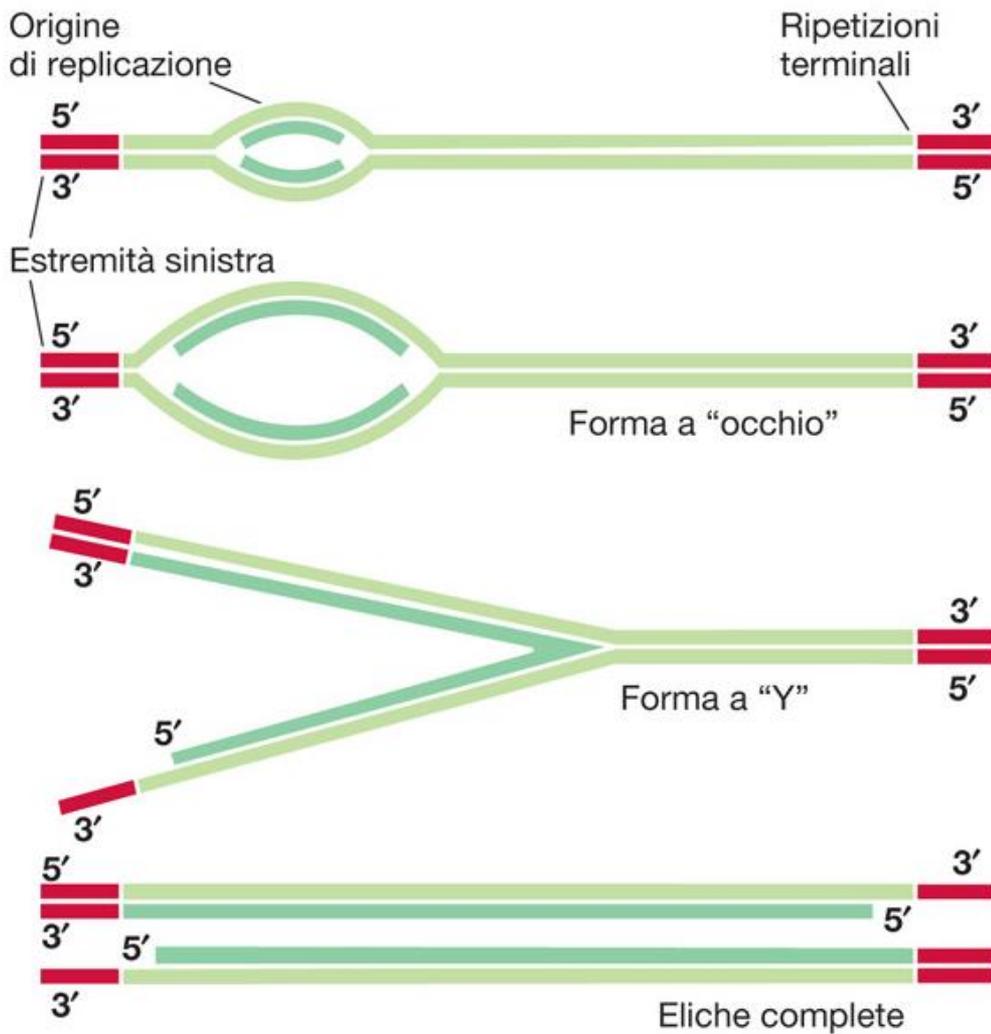


Fago T7 esprime tra i geni precoci immediati delle proteine che inibiscono il sistema di restrizione e modificazione dell'ospite.

Sia i promotori dei geni intermedi e dei geni tardivi di T7 sono trascritti dalla **T7 RNA polimerasi**.

I geni tardivi hanno una sequenza consensus per la T7 RNA polimerasi più fedele rispetto ai geni intermedi determinando così soltanto la loro trascrizione nelle fasi tardive del ciclo

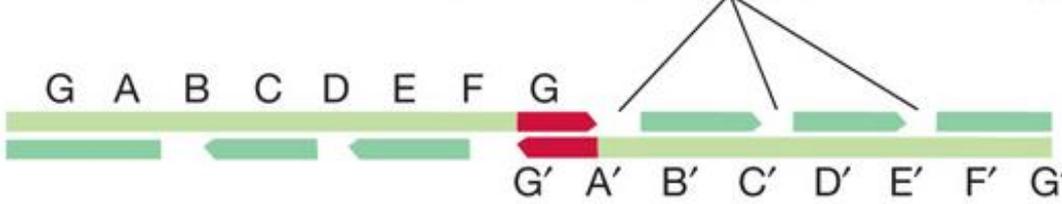




Il DNA di T7 è lineare
:l'origine è in posizione
asimmetrica

Presenza di una
ripetizione terminale
diretta di 160 bp
all'estremità della
molecola.

Attività della DNA polimerasi e DNA ligasi

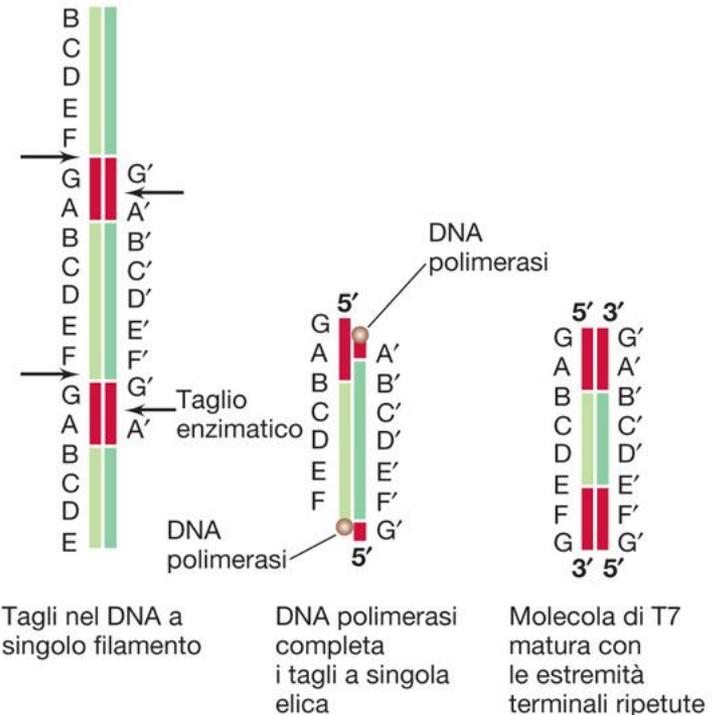


Appaiamento delle ripetizioni terminali non replicate



Unione di nuove e vecchie molecole attraverso l'azione di una DNA polimerasi e DNA ligasi per la formazione di un concatenamero

Replicazione di T7
Le estremità terminali possono appaiarsi formando concateneri



);

<i>Mimuti</i>	T4	T7
0	Adsorbimento del fago e iniezione del DNA	Adsorbimento del fago
0-1	Inizio sintesi di mRNA precoci immediati	Inizio iniezione del DNA fagico
1	Blocco della sintesi di DNA, RNA e proteine dell'ospite	
2	Inizio sintesi di mRNA precoci ritardati	Inizio sintesi di mRNA
3	Inizio degradazione del DNA batterico	
4		Blocco della sintesi di DNA, RNA e proteine dell'ospite
5	Inizio sintesi del DNA fagico	
8-9		Inizio sintesi del DNA fagico
9	Inizio sintesi di mRNA tardivi	
8-10		Inizio sintesi di proteine strutturali del fago e completamento iniezione del DNA fagico
12	Prime teste e code fagiche	
15	Prime particelle fagiche complete	Prime particelle fagiche complete
22	Lisi batterica e rilascio della progenie fagica	
25		Lisi batterica e rilascio della progenie fagica

The families of some major bacterial viruses

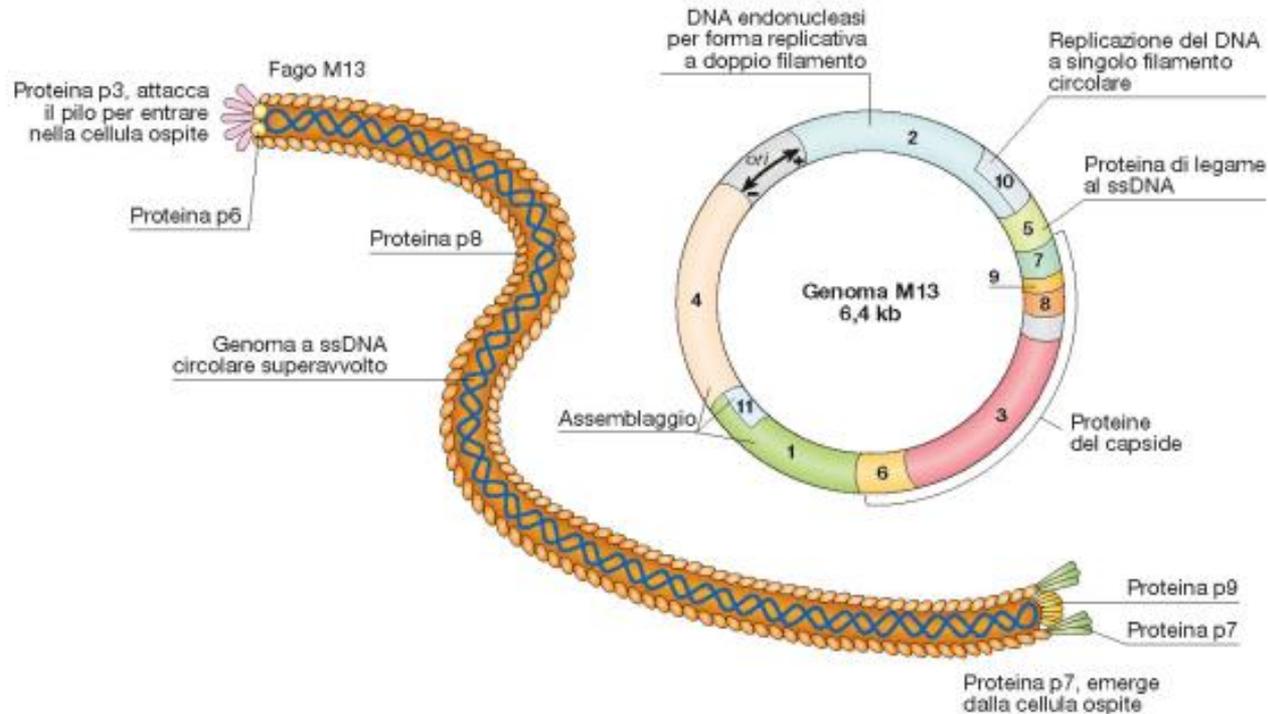
<u>DNA ds – linear</u>	<u>Size (nm)</u>	<u>Example and organism attack</u>	
Siphoviridae	Head 90 Tail 200 ∞ 15	λ (E. coli)	
Myoviridae	Head 80 ∞ 110 Tail 110 ∞ 25	T4 (E. coli)	
<u>ds – circular</u>			
Corticoviridae	60	PM2 (Pseudomonas)	
Plasmaviridae	50 to 120 (enveloped)	MV12 (Mycoplasma)	
<u>ss – circular</u>			
Microviridae	30	φ ∞ 174 (E. coli)	
Inoviridae	9 ∞ 890	M13 (E. coli)	
<u>RNA ds – linear</u>			
Cystoviridae	85	φ6 (Pseudomonas phaseolicola)	
<u>ss – linear</u>			
Leviviridae	30	MS2 (E. coli)	

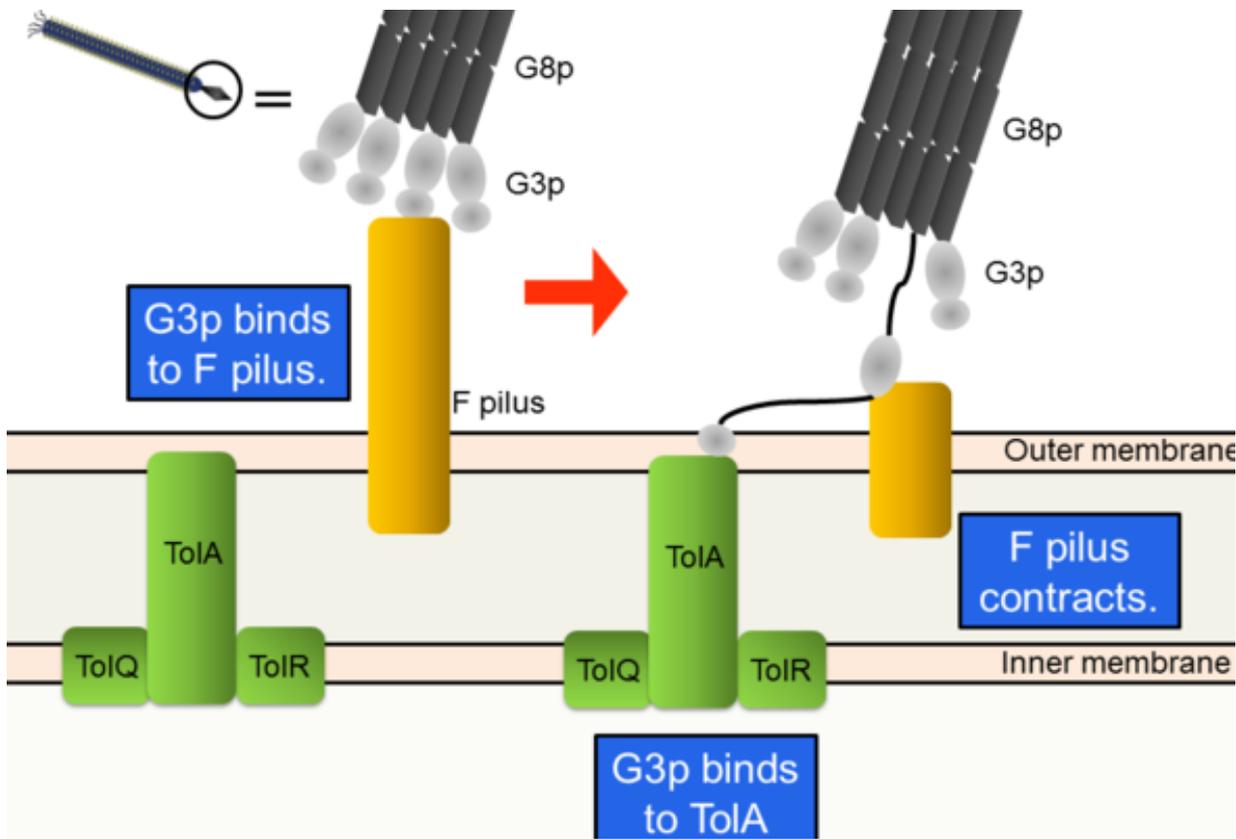
Il fago M13:

un fago filamentoso con genoma a DNA a singola elica

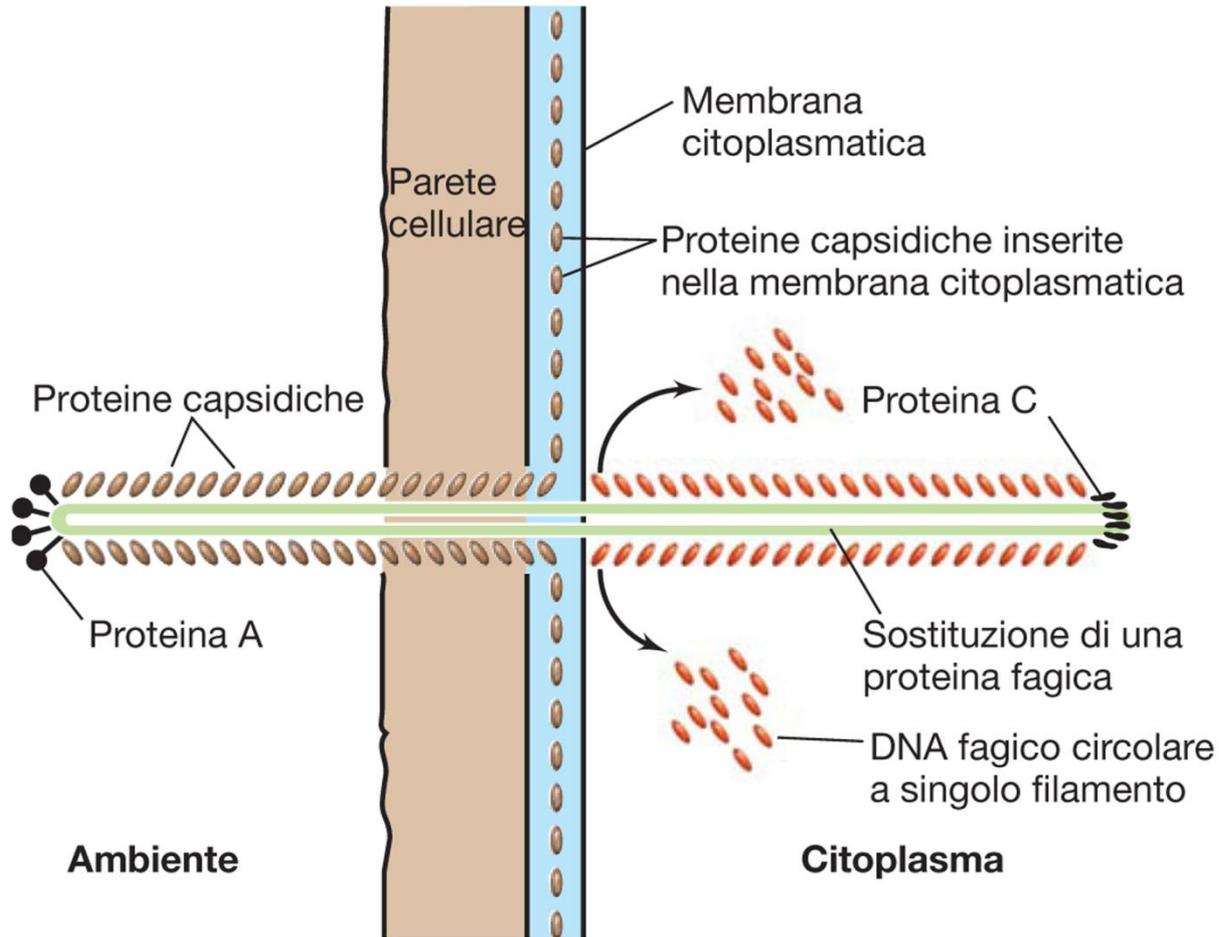
Contiene circa 10 geni

Si adsorbe ai pili coniugativi (infetta esclusivamente le cellule con Plasmidi di tipo F)

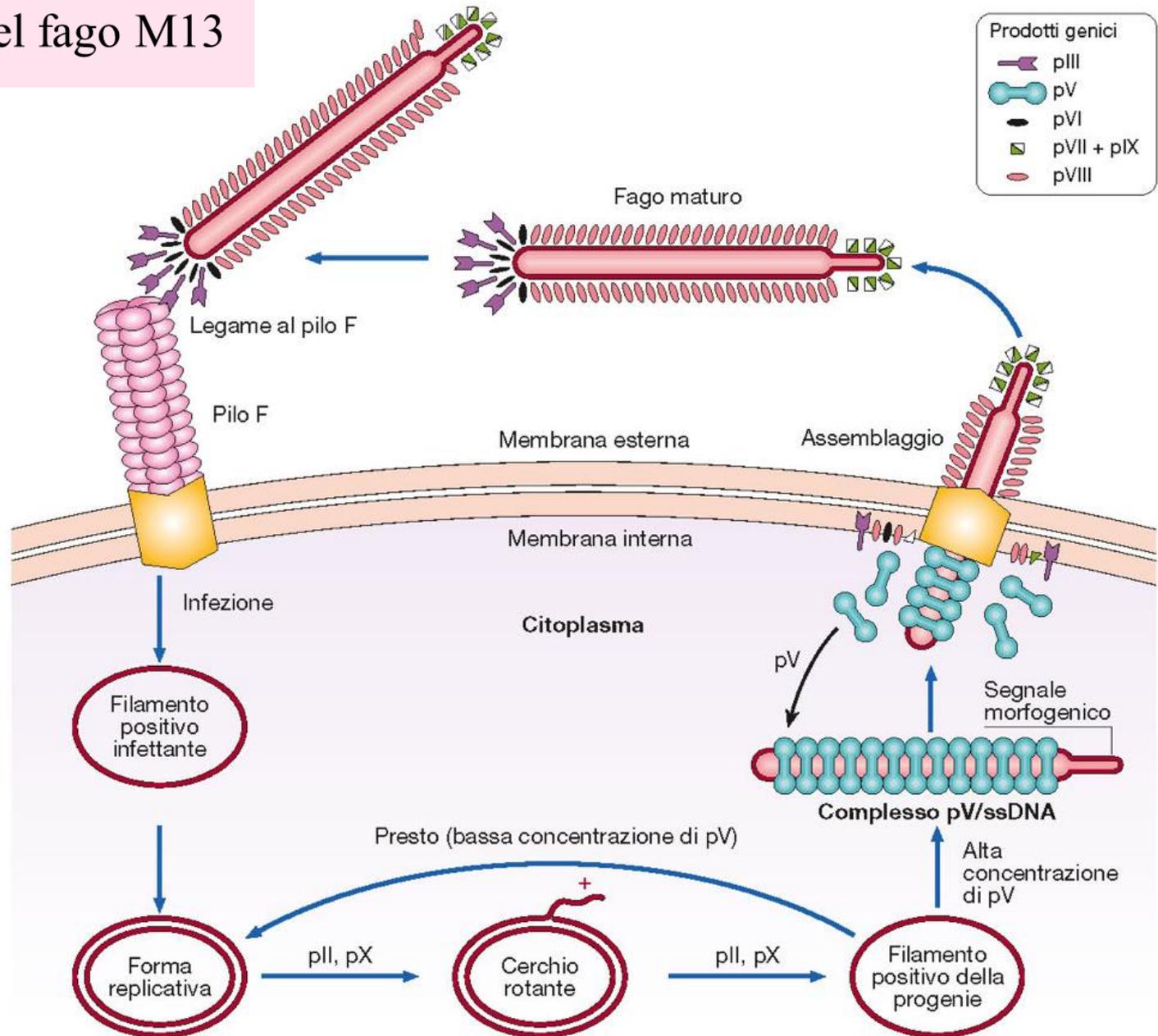


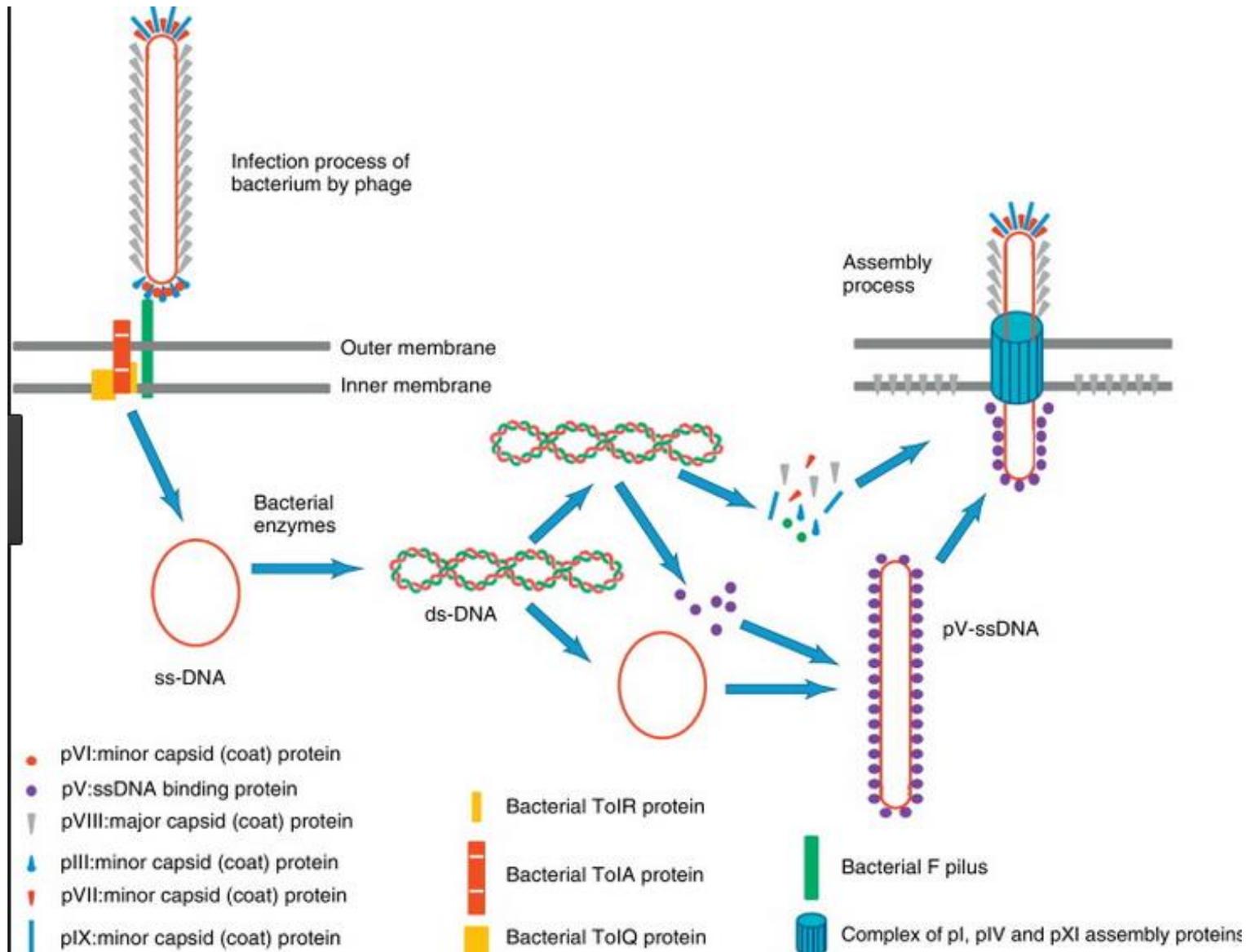


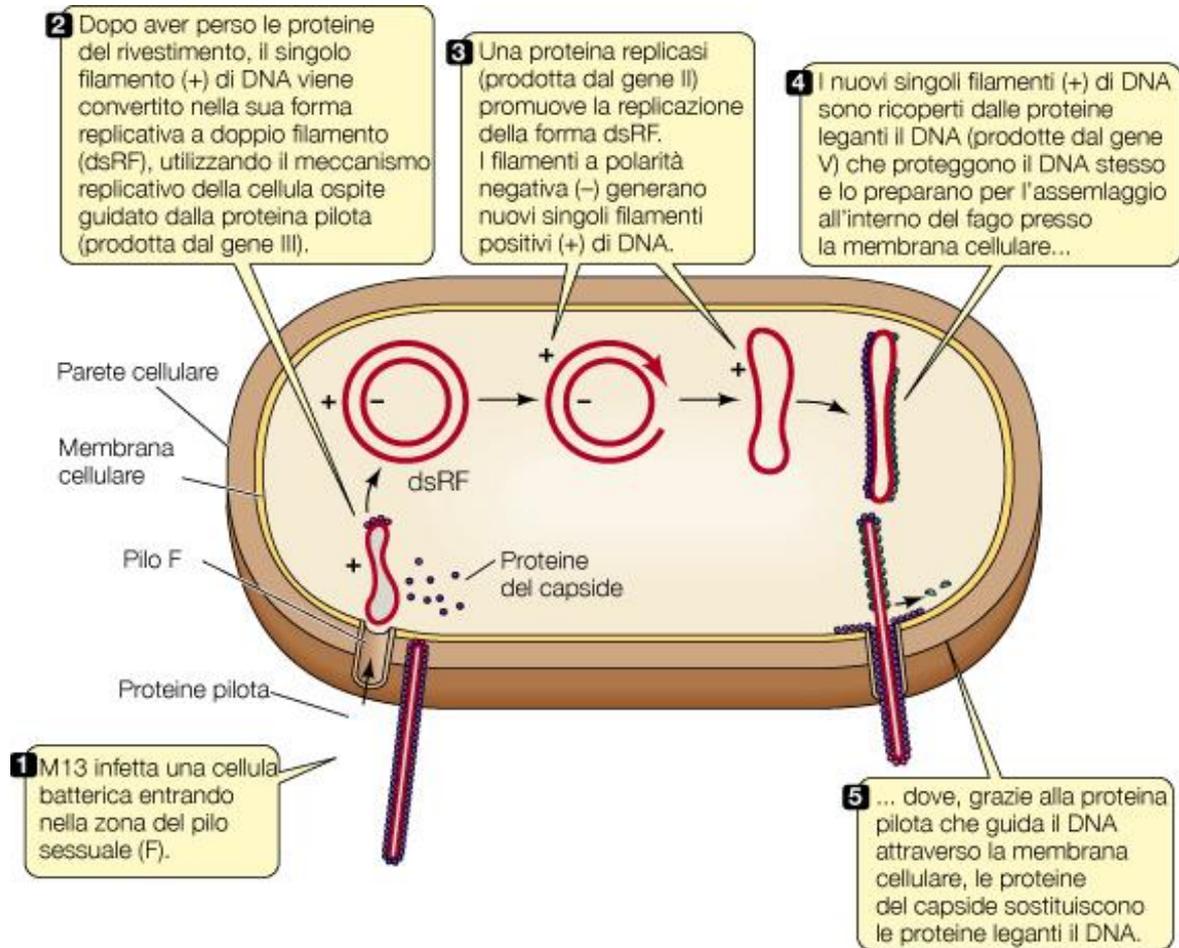
Formazione del rivestimento del fago filamentoso M13: il fago è virulento ma non provoca lisi della cellula ospite



Ciclo vitale del fago M13



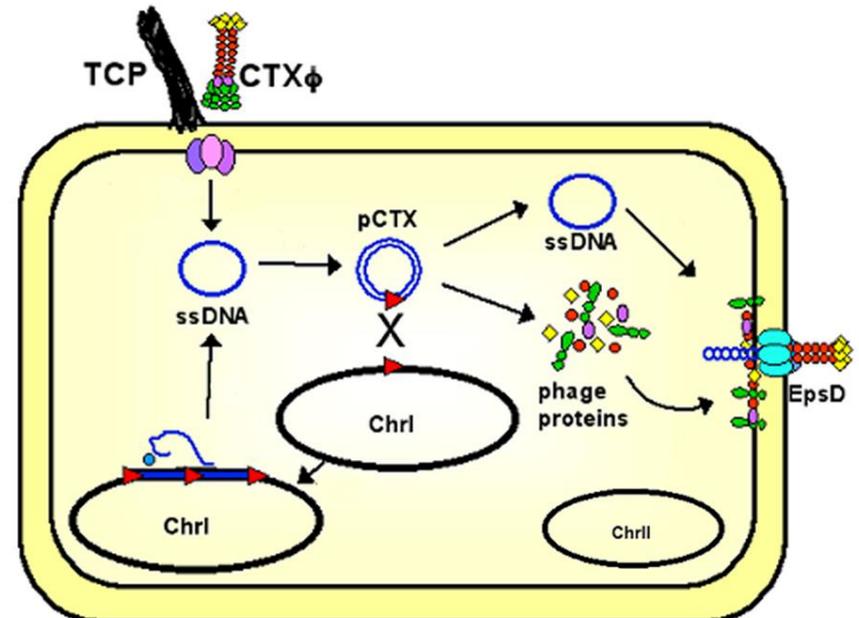
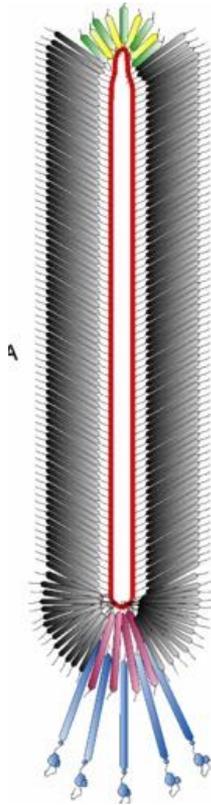




Il fago CTX di *Vibrio cholerae*

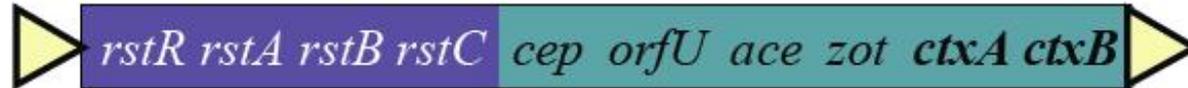
Ma chi è il fago CTX?

- è un fago filamentoso simile al fago M13 o F1 di *Escherichia coli*
- è un fago a DNA a singolo filamento di 7.000 basi capace di integrarsi nel cromosoma
- è un fago che codifica la tossina colerica (CtxAB) e altre tossine.



Vibrio cholerae, l'agente eziologico del colera è un batterio Gram negativo. I ceppivirulenti appartengono al sierogruppo O1 e O139. I fattori di virulenza principali sono la tossina colerica CTX e il pilo coregolato con la tossina (TCP) che tiene assieme le cellule batteriche in modo che possano resistere ai processi di dilavamento nell'intestino

Ceppi lisogeni per il fago filamentoso CTX Φ diventano tossigenici perché i geni per le subunità A e b della tossina sono localizzati sul fago.



La tossina colerica è sintetizzata da un fago di tipo M13 integrato nel genoma di *V.cholerae*.

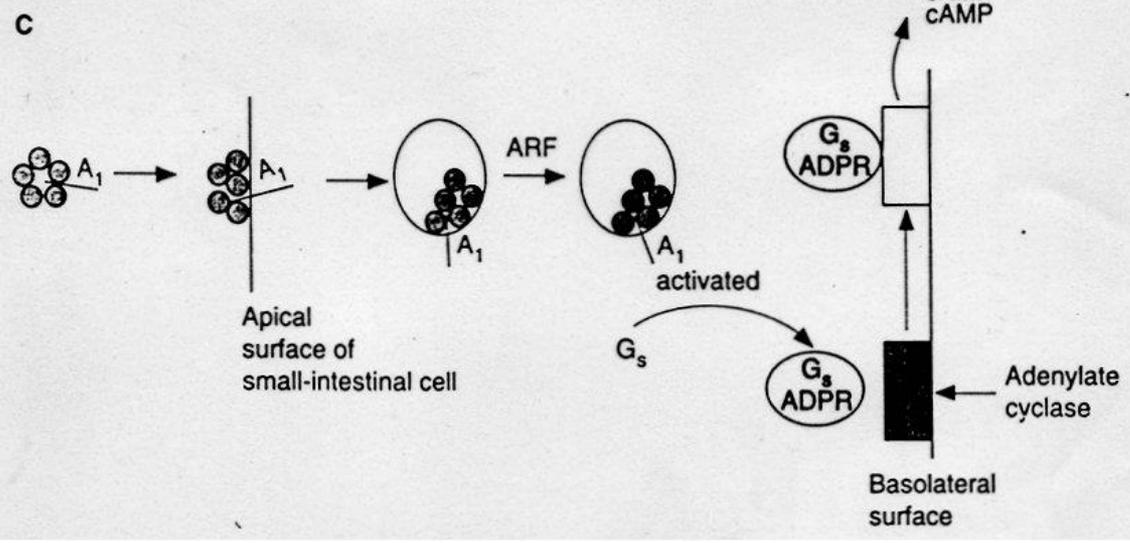
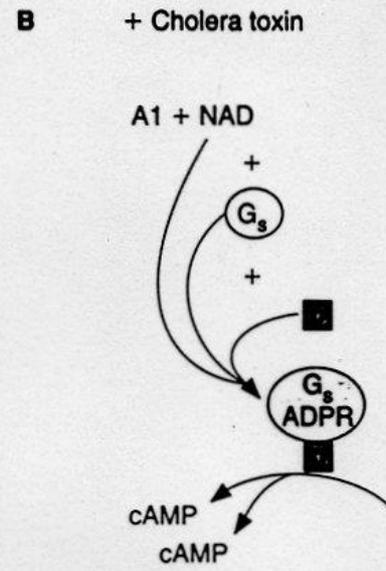
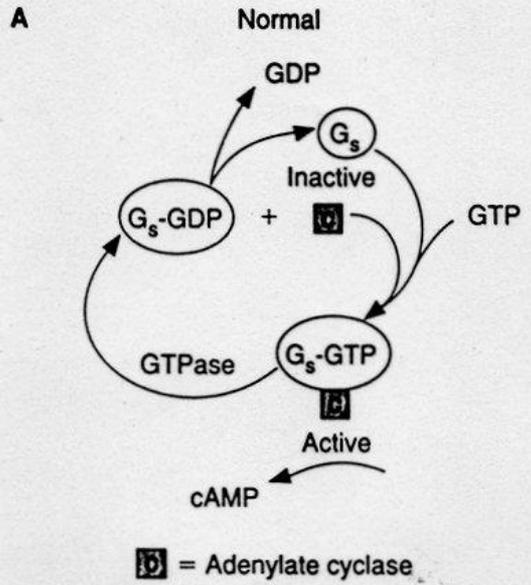
La tossina colerica (p.m.82 200) è una tossina di tipo A-B costituita da 1 **subunità A** di p.m.27000 e 5 **subunità B** p.m.11.600.

La subunità B contiene il sito di legame attraverso il quale la tossina colerica si combina con il ganglioside GM1 , un glicolipide complesso, presente sulla membrana citoplasmatica delle cellule epiteliali .

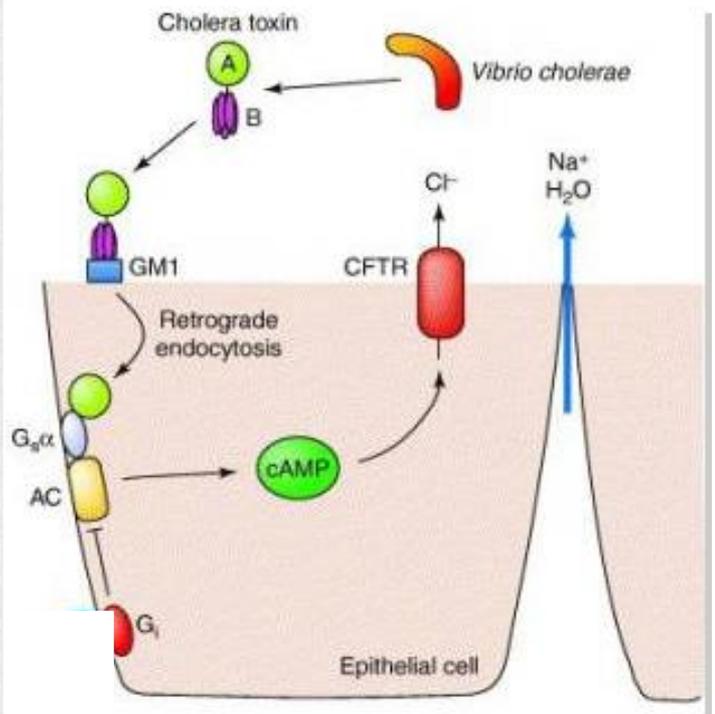
La subunità A è capace di attivare l'enzima ADENILATOCICLASI inducendo la conversione dell'ATP in AMPc. L'aumento dei livelli di cAMP provoca una secrezione attiva di ioni Cl^- nel lumen intestinale mentre si perde l normale afflusso di ioni Na^+ .

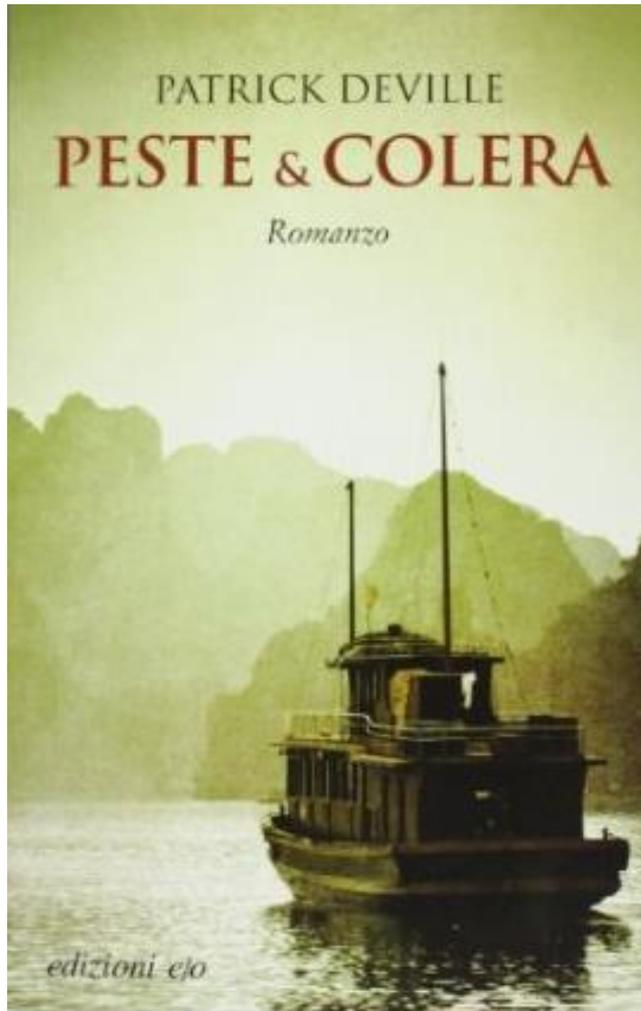
Questa alterazione ionica porta all'immissione di grandi quantità di H_2O nel lumen, con conseguente massiva perdita di liquidi e morte per disidratazione

La tossina colerica provoca l'ADP ribosilazione della proteina G



Cholera Toxin





Peste: causata da *Yersinia pestis*, batterio identificato nel 1894 a Hong Kong dal medico svizzero Alexandre Yersin, allievo di Pasteur ed indomito esploratore degli altopiani indocinesi

Colera: causato da *Vibrio cholerae*, batterio identificato e descritto da Filippo Pacini nel 1854 durante epidemia a Firenze e successivamente riscoperto da Robert Koch nel 1884 in Egitto

Filmato sull'assemblaggio del fago T4

https://www.youtube.com/watch?reload=9&v=Ofd_lgEymto