Computational prediction and experimental analysis

of RNA structures

Sonia Varriale¹, <u>Stefano Giacomell</u>i¹, Maria Rosaria Coscia¹, Claudio Rivetti², Umberto Oreste¹

¹Institute of Protein Biochemistry, CNR, Napoli ²Department of Biochemistry and Molecular Biology, Università di Parma

Double-stranded RNA

dsRNA appears to be a fundamental component of life:

Since long time it is known that the genome of retroviruses, such as the hepatitis C and human immunodeficiency viruses, consists of dsRNA.

Many cases of hairpins formed by local base-pairing of dsRNA have been analyzed.

dsRNA has been demonstrated to interact specifically with a wide spectrum of proteins such as nucleases, helicases, and polymerases.

The recent discovery of the role of dsRNA in the mechanism of RNA interference has renewed interest in the determination of RNA secondary structure.

RNA secondary structure prediction tools

In 1986 Turner reported 11 thermodynamic parameters for prediction of RNA duplex stability.

In 2003 Zuker developed a dynamic programming algorithm to predict nucleic acid folding and hybridization, using Turner free energy parameters and constructed the package mfold.

In 2003 Knudsen introduced the tool Pfold RNA secondary structure prediction using stochastic context-free grammars.

In 2009 Lu et al. improved RNA secondary structure prediction by maximizing expected pair accuracy.

In 2010 Bellaousov and Mathews introduced Probknot for prediction of RNA secondary structure including pseudoknots.

In 2010 Lou and Clot used Wang-Landau sampling to calculate thermodynamics of RNA structure.

mfold

The portal for the mfold web server is: http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold.

The server provides access to both RNA and DNA folding and hybridization software.

The lenght limit is currently 8000 nt.

The folding temperature ranges between 0 and 100 ° C.

 Na^+ concentration can vary between 0.01 and 1 M, Mg^++ concentration between 0 and 0.1 M.

It is possible to introduce constraints to force or prohibit a string of consecutive base to pair.

A parameter controls how many foldings will be computed and how different they will be from one another.

The thermodynamic outputs include estimated free energy, enthalpy, entropy and T_m .

Single-molecule techniques

Confocal microscopy: a laser excites, through the objective of a microscope, only a small area.

Total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM): the exciting laser is reflected through a prism, and the emission goes through the objective.

Optical tweezers experiments: a laser provides an attractive or repulsive force depending on the refractive index.

Fluorescence resonance energy transfer (FRET): a donor chromophore transfers energy to an acceptor chromophore through non-radiative dipole-dipole coupling.

Atomic force microscopy (AFM): a cantilever is used to scan a surface to produce an image.

Atomic Force Microscopy

AFM is a very high-resolution type of scanning probe microscopy, with demonstrated resolution in the order of fractions of nanometer.

The information is gathered by "feeling" the surface with a mechanical probe. Piezoelectric elements that facilitate tiny but accurate and precise movements on (electronic) command enable the very precise scanning.

The AFM provides a three-dimensional surface profile.

Samples observed by AFM do not require any special treatments.

Most AFM modes can work perfectly well either in ambient air or even in liquid environment. This allows us to study biological macromolecules and also living organisms.



Splicing of pre-mRNA encoding the membranebound form of Immunoglobulin heavy chain in Antarctic teleost



Synthesis of an RNA molecule corresponding to the genomic region

RNA was synthesized from a recombinant 4567nt-DNA template of the Antarctic teleost *Chionodraco hamatus* using the RiboMAX Large Scale RNA Production System (Promega).

The DNA template was linearized by digestion with *Hind* III prior to *in vitro* transcription.

The transcription reaction was carried out under the control of the T7 RNA polymerase promoter.



 $\Delta G^{0^{\circ} c}$ (S/APSO) = - 2498 Kcal/mol (65%)

AFM image of the synthetic RNA folded on ice



Length: 244 \pm 16 nm Calculated bp number: 841 \pm 55

mfold structure prediction of the synthetic RNA at 25 $^\circ$ C



AFM image of the synthetic RNA folded at 25 ° C



Splicing of pre-mRNA encoding the membrane-bound form of Immunoglobulin heavy chain in non-Antarctic teleost





∆G^{25°C} = -1073 Kcal/mol



Different potential pairing of anti-parallel regions of Antarctic teleost pre-mRNA

	ACM 2
AAGAUAUGUCCAAUAUGUCCCGqucccqquaaauqacuacuuuaucuu	ua 10
aaaauuquauacaaaqaquucaauuuuuqauquuuuuqcaqccaucuci	1001 1.5
uuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuu	190 10
uuaauaauucuucacugucuccucauuuaaagauggcacagauuguco	20 ZU
uagcagaugcggauguacauaucaucgaacccucaauggaggacaugu	uua 25
uuacaccacaaaggaacgguaucuugucaagucacgguuaacaaccca	auc 30
	35
nengganaagannnegngggagaeegngaenggaaangeaanagangi	Jug 50
cugacccaauuaccaaccuuaaggaccguaagggaguauuuguugcug	Jaa 40
cuuaccaucacguaugaagaauggauaaagggcaccacguuugucugo	caa 45
gguggaacauaaagauuggauggagccacuuaaaaaauccuaccaaad	rga 50
uuaaugguaagaaucuauggagcaauuguucaaaaccuguuuucaau	1CC 55
ucuuqucauqqqauqaaaqaqququuauquuuuuququauuauquaq	50
accugacaageeaacacgagaaacaagagaaaagagagaaga	25
ggauuuucuucuuaguucuucuaucuguggeeagageeeuaauugu	100 65
cuaaugcuugcaggaggaacgacucagcguccaucaguguuuaugcua	acc 70
uccecuagaacauacuaaaaaagacacggugacecugacuugcuuagu	iga 75
aagacuucuacccgaaguauguguuuguggcuuggcucguugaugau	cug 80
gaaucaggcuuacaauacaacaccacaagcccuauagaaaaccaggga	auc 85
cuauucugguuauggccaguuaagucucagcguugaagaguggaagga	90
ouauouyouuuuyyoouyuuuouououyoouuyuuouyuyyuuoy	0.5
augacacuguguauagcuguguuguuuaccaugagucuauggucaaaa	aca 90
ggaacuaaagccauugucagauccauugggcacagaacauuugaaaga	ac 100
caaccuggucaaccucaacaugaacauccecgauacgugcaaggeeca	aca 105
auuagaugugauucugugucacugugucuucggcuguuuguu	aug 110
uuugugcuuguuauaucacauuguguuugucguuuuaaugcagauuca	aaa 115
auaaaaaaaucucuuugcaacucaguuguuguaugucgcaugcugu	iua 120
uququuuauucaauauuaquuuqauquccauquuuaucauacuuu	122 125
ugucuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuu	100 120
guguagagucacagugcuceccuaaugcaacacacauuagguuaagco	sau 130
ccguguguuaagcagugauuaaaauagaucaaauuuaacaacaucaco	cuc 135
acaaaaucuaaugaagaaaaucuauuuguuuauuguuuuuuguauaca	aua 140
quauuaccauuguuugugugacuugucuuugucuacguguguuucuac	cua 145
cuqqqucuuqcaqcccqacauaaqacaaauaquuauucacqqccaaau	uc 150
cadeucuauqueaaauaaauuaaauuaaguaauueacooggeeuuu	100 155
cuycucuuuyyucaaauaauyaauuyacuyauucacddgccdggucat	A99 100
cacauaaaggggucuuucaaaagcaauucaagaucauuguaggauga	5uu 160
uaauuaucauaaucaauuuuagugggaccuuuageecagecuuuuaca	acu 165
uacaauaaugcauacaguuacauuauuuaaauuuguaguuaaacuug	gau 170
ugacugccauugauuuaccguaguuucacacugaccugagguuauuaa	age 175
gugggggaggaagugauuaugauaugguaaucaucucaugagcuaua	uu 180
	185
gen	100
uaaacaacaacayceyaayacacayuyacacayaaucacaucuaau	igu 190
dddccnndcacdnancedddandnncandnndaddnndaceaddnndd	guu 195
cuuucaaauguucugugcccaauggaucugacaauggcuuuaguuccu	<mark>igu</mark> 200
uuugaccauagacucaugguaaacaacacagcuauacacagugucau	<mark>igu</mark> 205
cguuccacuguucaaggcugagaguuaacuggccauaagcagaauago	<mark>jau</mark> 210
cccugguuuuucuauaggggguuguuguuguuguauuguaaggceugauuc	215
	220
aucaucaacaayccacaaacacauacuucyyyuayaayucuu	220
cuaagcaagucagggucaccauuucuuuuuaguauguucuaggggag	igu 220
agcauaaacacugauggacgcugagucguuccuccugcaagcauuaga	iga 230
acaauuagggcucuggccacagauagacgaacuaaagaagaaaaucco	5ug 235
	rga 235
acaauuagggcucuggccacagauagacgaacuaaagaagaaaaucc cuacauaauacacaaaaaaauaacacguguuugauggcaugacaagaq auugaaaacauuuuuugagcauugcuccauagauucuuaccauaau	ga 240
acaabuaggguuugggcacagabagacgaacuaagaagaaaabucc cuacaaaauacacaaaaaaaacacguguuugauggcaugacaaga auugaaaacauguuuuggcaauugcuccabagauucubaccauaaa uugaaaacauguuuugggcaauugcuccabagauucubaccauaaa	ga 240 100 245
accannadadcinadacacadanadacdaacnaadaadaaacco checanaanacaccaaaaaanaaccadnaanadacdaanacanaac andaaaacananadaadaaanaacdaaanaacdaadaadaacaanaa acaannadadcinadacaanaacdaacaanaadaadaadaaaacco accannadadcinadacaanaacdaacaanaadaadaadaaaacco	ga 240 100 245 100 250
acaanuuaggoucugucacagaugacgaacuaagaagaaaauco cuacuaauaucacaaaaaaauaacacquguungaugcaugacaaqaa uuugguagguucuguaggocaauugcuccauagauucuuaccauuau uuugguagguucuguaggugcocaucaaauumauguuccauca uuugguagguucuguaggugcocaucaauumauguuccauca uuugguagguucuguaggugcocaucaauumauguucaacu	ga 240 100 245 100 250 100 255
ice atu ua gigo congece ca ga ua ga cya cuta a ga aga ata u cor cun cu ua ua ca a ana ana ana ca ga ga ua ga ga ga aga ata u cor ua ga aga ga ua ga ua ga ga ga ga ga ga ga ga ga ga uu ga aa aga uu ga ga uu ga aa aga uu ga ga ga ga ga ga ga ga ga ga uu ga aa aga uu ga ga ga cau aa au ac uccoga aga gu cucu a gg gu ga ga ga ga ga ga cau aa au ac uccoga aga gu cucu a gg uu ga au ug ga au gg gu ag ga cau aa au ac uccoga aga gu cucu a gg uu ga aa ug ga u ga ga ga ga ga ga cau aa au ac uccoga aga gu cucu a gg uu ga aa ug ga u ga ga ga ga ga ga ga ga cau aa au ac uccoga aga gu cucu a gg uu ga aa ug ga u ga	gga 240 100 245 100 255 100 255 200 260
acaatuaaggouruggocacagatuagacgaacuaagagaaaaucco cuacaataatucaaaaaatuaacacguguuggoqocayacaaga auugaaacauguuuggacauuguuccauagauucuuaccauuaa uuuggaagguuuugaagugoccuutatuccaucautucuuccaca cagacaaacuuggugoccuutatuccautucuucatacgugaugguaag agaatuaaatuacucogucuucautucuucatacgugaugguaag agaatuaagauuuccagucuucggucutuccacgaaatucuaaccaga	235 102 240 102 245 102 255 102 255 102 260 102 265
	235 gga 240 1uc 245 1uc 255 1uc 255 cac 260 gau 265 1aa 270
	235 299a 240 245 245 245 245 245 255 260 265 260 265 260 275 260 275
	200 235 300 245 100 245 100 255 100 255 260 265 300 265 100 265 100 265 100 265 100 265 100 275 280 280
	200 235 300 245 100 245 100 255 100
	235 gga 240 1uc 245 1ug 250 1uc 255 2ac 260 gau 265 1aa 270 2ag 275 2ag 275 2ag 275 2ag 275 2ag 275 2ag 280
	235 gga 240 1uc 245 1ug 250 1uc 255 1uc 265 1uc 285 1ua 285 1ua 285
	235 gga 2400 100 2450 100 2550 100 2550 100 2650
Lead to a sub-sub-sub-sub-sub-sub-sub-sub-sub-sub-	235 gga 2450 1uc 2450 1uc 255 245 265 242 265 242 265 242 265 242 265 242 265 242 265 242 265 242 275 222 275 223 2275 224 285 1ua 285 1ua 290 JGA 295 1uu 300
	ug 235 gga 240 uuc 245 uug 255 cac 265 gaa 270 cad 270 cad 275 cac 265 gaa 275 cad 290 JGA 2955 auu 300 cau 305
	235 235 35 240 1102 245 1102 255 220 255 220 255 220 265 220 265 220 270 220 270 220 275 220 285 200 205 201 205 202 275 203 275 204 295 204 205 205 201 205 201 205 201 205 201 205 201 205 201 205 201 205 201 205 201 205 201 205 201 205 201
	cug 235 jga 240 uuc 245 cuuc 255 cuuc 255 cuu 265 cuuc 265 cuuc 265 cuuc 275 cuuc 285 nuu 290 JGA 295 nuu 300 cuu 305 guug 310 cau 315
	Lig 235 Jgg 240 Luc 245 Luc 255 Luc 260 Luc 270 Cou 280 Luc 285 Luc 290 Luc 285 Luc 285 Luc 300 Cou 300 Cou 305 Luc 315 Luc 315
	235 245 245 245 245 245 250 260 255 261 255 262 260 255 262 260 275 261 275 262 275 263 270 275 260 275 261 270 275 275 275 275 275 270 275 270 275 275 275 275 275 275 275 275 275 275 275 275 275 275 275
	Sug 235 Sug 240 Sug 240 Sug 255 Sug 255 Sug 255 Sug 255 Sug 255 Sug 265 Sug 255 Sug 255 Sug 255 Sug 275 Sug 285 Sug 300 Sug 310 Sug 310 Sug 320 Sug 325
	cug 235 gg 240 uug 250 uug 250 cug 250 cac 260 cac 300 cac 315 cac 320 cac 320 cac 300
	Lug 235 gga 240 Lug 245 Lug 255 Cac 260 gau 265 Cac 260 gau 265 Cac 260 gau 265 Cac 260 Lua 285 Luu 200 Luu 300 Cuu 305 Cuu 305 Luu 325 Luuu 325 Luuu 325 Luuu 335
	Lug 235 gd 240 Luc 255 Luc 255 Luc 255 Luc 255 Luc 255 Luc 265 Luc 265 Luc 265 Luc 265 Luc 265 Luc 285 Luc 285 Luc 285 Luc 285 Luc 285 Luc 300 Luc 315 Luc 325 Luc 325 Luc 330 Luc 335 Luc 335
a ca atu ang ag putung ap ca atu ag ang ang ang ang ang ang ang ang ang	Lig 235 Lig 235 Lig 255 Lig 255 Lig 255 Lig 265 Lig 270 Lig 295 Lig 315 Lig 210 Lig 312 Lig 312 Lig
	235 235 gga 240 uuc 255 uuc 255 uuc 255 uuc 265 uuc 265 uuc 265 uuc 265 uuc 265 uuc 285 uuc 285 uuc 285 uuc 285 uuc 285 uuc 285 uuc 295 uuc 300 uuc 325 uuc 325 uuc 325 uuc 300 uuc 325 uuc 325 uuc 330 320 340 340 340
	cug 235 cug 245 cug 250 cug 255 cug 255 cug 265 cug 265 cug 265 cug 265 cug 275 cug 280 cug 280 cug 280 cug 280 cug 280 cug 295 cug 295 cug 305 cug 315 cug 330 cug 335 cug 345 cug 345 cug 345
	gag 245 gauc 245 uuc 255 cac 260 gau 265 cac 260 gau 245 cac 260 gau 265 cac 260 cad 275 cau 265 aug 290 JGA 295 aug 290 JGA 225 aug 305 cau 315 aug 320 cuu 325 aag 340 Cocc 345 acc 350 aag 355
	cug 235 cug 235 cug 245 cug 250 cug 255 cac 260 caa 270 caa 270 cocu 280 cuu 285 cuu 200 cuu 285 cuu 300 cuu 305 cuu 300 cuu 305 cuu 305 cuu 305 cuu 305 cuu 305 cuu 325 cuu 325 cuu 325 cuu 325 cuu 335 cacc 350 cacc 350 cacc 350 cuu 365 cuu 365
a ca atu ua gi gi u ua gi poca ca gi u a gi u gi a gi a gi a gi a gi a g	cug 235 gq 240 uug 250 uug 250 uug 250 uug 250 uug 250 uug 250 uug 260 gau 265 uug 270 ccu 280 uug 290 UGA 295 uug 300 ccuu 300 ccuu 305 aug 320 uug 325 aug 340 ccc 345 auc 355 aug 365
	Lug 235 Lug 245 Lug 245 Lug 250 Lug 250 Lug 250 Lug 250 Lug 255 Cac 260 Luda 275 Cocu 280 Lua 285 Luu 300 Cau 315 Luu 320 Luu 325 Luu 330 Cac 340 Luu 330 Cac 345 Luu 355 Luu 355 Luu 355 Luu 355 Luu 370 Luu 370 Luu 370
	cuug 235 gqa 240 uug 250 uug 250 uug 250 uug 250 uug 250 uug 250 uug 260 gau 265 uug 270 ccuu 200 uug 290 uug 290 uug 290 uug 290 uug 290 uug 300 ccuu 300 uug 310 gccu 330 gccu 330 gccu 355 aug 365 aug 365 cuu 375
	235 235 sqc 240 supc 255 sqc 260 sqc 255 sqc 260 sqc 275 sqc 285 sqc 285 sqc 300 gug 310 sqc 310 sqc 310 sqc 310 sqc 345 sqc 350 sqc 350 sqc 350 sqc 360 sqc 370 sqc 370 sqc 370 sqc 375 sqc 375
	cug 235 gg2 240 uug 255 cac 265 cac 255 cac 260 gau 265 cac 270 cac 270 cac 270 cac 275 cac 280 uua 285 cac 255 cac 255 cac 305 cac 355 cac 355 cac 355 cac 375 cac 365 cac 375 cac 375
	Ultrage 233 Ultrage 245 Ultrage 255 Ultrage 260 Ultrage 260 Ultrage 260 Ultrage 260 Ultrage 260 Ultrage 260 Ultrage 270 Ultrage<
	Ulig 233 232 232 232 232 232 232 232
	Ulug 233 2404 2507 2607 2707 2707 2707 2707 2707 2707 2707 2707 2707 2707 2707 2707 2707 2707 2707 2707 2707 2707
	Ulu 233 1000 100
	bill 233 240 244 250 254 261 255 270 261 271 262 272 262 272 262 272 262 272 272 272 272 272 272 273 272 274 272 274 272 274 272 274 272 274 272 274 272 274 272 275 273 274 273 275 273 275 274 275 274 275 274 275 274 275 274 275 274 275 274 275 274 275 274 275 274 275
	Ulug 233 2404 2507 2607 2607 2607 2607 2757
	Ulug 233 2404 250 260 270 280 281 281 282 283 284 283 284
	Ulug 23 Ulug 23 Ulug 24 Ulug 24 Ulug 25 Ulug 25 <td< td=""></td<>
	Uiii 2 23 Uiii 2 24 Uiii 2 25 Uiii 2 26 Uiii 2 27 Uiii 2 28 Uiii 2<
	Uiii 2 23 Uiii 2 24 Uiii 2 25 Uiii 3 30 Uiii 4 30 Uiii 4 30 Uiii 4 30 Uii 4 30 Uii 4 30
	Uiii 2 23 Uiii 2 24 Uiii 2 25 Uiii 2 26 Uiii 2 27 Uiii 2 27 Uiii 2 28 Uiii 3 36 Uiii 3 36 Uiii 3 36 Uiii 3 375 Uiii 4 39 Uiii 4
	Ling 2.53 Ling 2.54 Ling 2.54 Ling 2.54 Ling 2.55 Ling 2.56 Ling
	24444 2450 2450 2450 2450 2450 2450 2450
	Ling 2.33 Ling 2.44 Ling 2.45 Ling
	19 23 19 23 240 245 240 245 240 245 240 245 240 245 240 245 240 245 240 245 240 245 240 245 240 245 240 245 240 245 241 245 241 245 241 245 241 245 241 245 241 245 241 245 241 245 241 245 241 245 242 240 243 240 244 240 243 240 244 240 244 240 245 240 245 240 245
	Ling 233 Ling 233 Ling 244 Ling 244 Ling 244 Ling 245 Ling 2

UGUUUGAGGGAAAGGGGAAAAAGUAUCGUGAUUAAAAGGCUCAUCAC AAGAUAUGUCCAAUAUGUCCCGgueeeggua aauga cua cuusau cuus aaaa uugua ta caa aga guucaausuu caaguuu uuge cag ca cu cu cugu uu aa uu cuu caa cugu cu ce cu cau uu sa aga ugg ca cag a uugu cu bara aau cuu cacaguu cu cu cu uu sa aga ugg ca cag a uugu cu	10
AAGAUAUGUCCAAUAUGUCCCGguccegguaaaugacuacuuuaucuuu aaaauuguauacaaagaguucaauuuucauguuuuugcagccaucucug uuaauucuucacaugucuccuucauuuaaagauggcacagauuguccuu	10
aaaauuguacaaagaguucaauuucaagauggacaggaugucuu uua <mark>auauuguucuucacuguucucucuuuaaagauggacaagaugucuu</mark>	
uuaauauucuucacugucuccucauuuaaagaugcaacagauugucuu	. 10
	20
hadcadahdcddahdhacahahcahcdaaccchicaahddaddacahdhii	20
undendende dan en angeneeren en anden anden anden ander an	25
uuacaccacaaaggaacgguaucuugucaagucacgguuaacaacccau	30
ucuggauaagauuucgugggagaccgugacuggaaaugcaauagauggu	- 35
cugacccaauuaccaaccuuaaqgaccguaaqqqaquauuuquuqcuqa	40
cuuaccaucacquauqaaqaauqqauaaaqqqqcaccacquuuqucuqca	45
aanaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa	50
gguggaacauaaagauuggauggageeacuuaaaaaaueeuaeeaaagg	50
uuaaugguaagaaucuauggagcaauuguucaaaaccuguuuucaauuc	55
ucuugucaugccaucaaacacguguuaucuuuuuguguauuauguagca	60
ggauuuucuucuuaguucuucuaucuguggccagagcccuaauuguuc	65
cuaaugcuugcaggaggaacgacucagcguccaucaguguuuaugcuac	70
uccccuagaacauacuaaaaagacacggugacccugacuugcuuagug	75
a se se su a se se se se su a se su a se	0.0
aagacuucuaceegaaguauguguuuguggeuuggeueguugaugaueu	00
gaaucaggcuuacaauacaacaccacaagcccuauagaaaaccagggau	85
cuauucugcuuauggccaguuaacucucagccuugaacaguggaacgac	90
augacacuguguauagcuguguuguuuaccaugagucuauggucaaaac	95
ggaacuaaagccauugucagauccauugggcacagaacauuugaaagaa	100
caaccingmicaaccincaacaingaacaincoccgaaiacguugoaaggoogaci	105
caaccuyyucaaccucaacauyaacaucoocyauacyuycaayyoocao	110
auuagaugugauucugugucacugugucuucggcuguuuguu	110
uuugugcuuguuauaucacauuguguuugucguuuuaaugcagauucaa	115
auaaaaaaaucucuuugcaacucaguuguuguaugucgcaugcuguuu	120
ugucuuuauuauucaauauuaguuugaucuccauguuuaucauacuuua	
gugua gaguca cagug cu co co u a aug caa ca ca u u a gguu a ag co a	1.30
303000003030000000000000000000000000000	1 2 5
coyuyuyuuuycayuyauuaaaauayaucaaauuuaacaacaucaccu	140
aceaaaucuaaugaagaaaaucuauuuguuuauuguuuuuuuguauacau	140
guauuaccauuguuugugugacuugucuuugucuacguguguuucuacu	145
cugggucuugcagcccgacauaagacaaauaguuauucacggccaaauu	: 150
cagcucuauggucaaauaaugaauugacugauucacaagccaggucaug	155
cacauaaaqqqqucuuucaaaaqcaauucaaqaucauuquaqqauqacu	160
uaauuaucauaaucaauuuuagugggaccuuuagcccagccuuuacaci	165
Dacaabaabgcabacadbaacabbaabaabaabaabaabaabaabaabaabaabaab	170
uacaadaadgcadacagddacaddadddaaadddgdagddaaacddgga	170
ugacugccauugauuuaceguaguuucacacugaeeugagguuauuaag	1/3
guggggggggggggggggguguuaugauaugguaaucaucucaugagcuauau	1 180
gcaucugcauuaaaacgacaaacacaaugugauauaacaagcacaaaca	185
uaaacaacaacagccgaagacacagugacacagaaucacaucuaauug	190
gggccuugcacguauccgggauguucauguugagguugaccagguuggu	195
cuuncaaauguncugugeeeaauggaucugaeaauggeuunagunceug	200
uuudaccauadacucaudduaaacaacacadcuauacacaduducauud	205
anayaccaadyacacaayyaaaacacaycaadacacayyacaady	010
cguuccacuguucaaggcugagaguuaacuggccauaagcagaauagga	210
cccugguuuucuauagggcuugugguguuguauuguaagccugauuccu	215
aucaucaacaagccaagccacaaacacauacuucggguagaagucuuuu	220
cuaagcaagucagggucaccauuucuuuuuuaguauguucuaggggagg	225
adcauaaacacudauddacdcudaducduuccuccudcaadcauuadad	230
	225
acaauuagggcucuggccacagauagacgaacuaaagaagaaaaucccu	200
cuacauaauacacaaaaaaauaacacguguuugauggcaugacaagagg	240
auugaaaacauguuuugagcaauugcuccauagauucuuaccauuaauu	245
uuugguagggucuuguaaguggcuccauccaaucuuuauguuccaccuu	250
cagacaaacuuggugeeeuuuaueeauueuueauaegugaugguaaguu	255
agcauusaauacucccguaagguccucaagguuggusauugggucagca	260
caaquauuqauuuccaqucucqqqucuccqacqaaaucuuauccaqaqa	265
aguuuguuaaceuugaeuugaeaauauaeeguueeuguguguguaaua	270
caugeeeuceauugaggguuugaugauauguaeaueugeaueugeuaea	2/3
gacaaucugugccgccuuuuuuaaaugaggacacagugaagaauuaucc	1 280
acgaguguuuuguauuguuuuacgucauguaggagaguuuuuucagucuu	285
ccauuaauccuuuqquaqqaucuuquaaquqququcaucuaaucuuuau	290
uuccaccuugcagaCABACUUGGUGUCCUUUGUCCAUGCCACACAUGUG	
	1 295
oogaaagaacagcaacaaaaacacccaaacggcccaaaaggaaggaag	300
	300
gggeegeeeeugaaaggaaaggaaaceeggacacceeeuaaaca	295 300 305
auccagagauauuuguuaaccuugacuugacaauauaccuuuccuuugu	295 300 305 310
guguaauaacauguucuccauugacuugacaauauaccuuucuuu	295 300 305 310 315
дудинизски и подали и подасни у подали и подали Подали и подали и под Подали и подали и под	295 300 305 310 315 320
gggotagataauuguuaaccuugcuugacaauaccuuccuugu guguaauaacauguccuccaugaggguugaugauaguacauccaca cugcuacaggacauuugugccgccuuuuuuaaaugagacacagugaa adyuaccuuacuaguguuuuguauguuuuuacgucauduagagaca	295 300 305 310 315 320 325
nne an constant ann an chuid an suid ann an chuid an suid an chuid an suid an suid an chuid an suid an sui Suid an suid an su	300 305 310 315 320 325 330
	300 305 310 315 320 325 330 335
An and a second	295 300 310 315 320 325 330 335
Processing a una unuquus acculta e cui geo a la sua consulucción un que grana mas e cui y uco caso e a una gran de la sua conservante o portener y acculta e una que que cui sua sua que a sua que a la sua sua cui sua que que cui sua que que sua que que sua sua que a sua sua cui sua que	295 300 305 310 320 325 320 325 330 330 340
алото ар за на изи изръзватели дестирателна на инстрицет спицира радиана на каза простоста са израд организата, на при при въз на са каза спореда на каза простоста са израд организата, на при при въз на са каза спореда са органа за изведирасерето изведита, на при при въз на са каза и за сели са каза изведирасерето изведита, на при при при въз на са на са са каза на съд при при ди ди израд на сели на при раз на са на са сила на са на съд на при на при на при при на при на на сила на са на са сила на при на при на при на при на на изведита на при на на изведита на при на на изведита на при на на изведита на при на при на при на при на при на при на на изведита на при на при на при на при на при на при на на при на при на при на при на при на при на при на на при на при на при на при на при на при на при на на при на при на при на при на при на при на на при на при на при на при на при на при на при на на при на при на при на при на при на при на при на на при на при на при на при на при на при на на при на при на при на при на при на при на на при на при на при на при на при на при на при на на при на при на при на при на при на на при на при на при на при на при на при на на при на при на при на при на при на при на на при на при на при на при на при на при на на при на при на при на при на при на при на на при на при на при на при на при на при на при на на при на при на при на при на при на при на при на на при на при на при на при на при на при на на при на при на при на при на при на при на при на на при на при на при на при на при на при на при на на при на при на при на при на при на при на на при на при на при на при на при на при на на при на при на при на при на при на на при на при на при на при на при на при на на при на при на при на при на при на при на при на на при на при на при на при на при на при на на при на при на при на при на при на при на на при на при на при на	295 300 305 310 320 325 320 325 330 340 345
nice a gia gua uuuguua accuuga cui ga ca ii a ua cou uu cuu uu uu guga a naa cuu gu cou ca uu ga ggu uu ga uu gu a au co a a accu cuo cuo co gga ana uu gu cuu ca uu gu gu au gu a agu gu a cu agu ga a agu a cuu a cuu a uu gu uu uu gu uu gu uu agu cuu ga ggu a cu agu ga a agu a cuu a cuu a uu gu uu uu gu uu gu agu acuuga ga ggu uu uu ca gu cuu ac cuu au accuugu agu agu agu au au cuu agu cuu ac cuu au accuuga aga CAAA gu GU GU GU CUC CUI CC GU CUI CUI CUI CUI CUI CUI CUI CUI CUI CU	295 300 305 310 315 320 325 335 340 345 350
2.0.5.5.6.6.6.6.6.6.6.6.6.6.6.6.6.6.6.6.6	295 300 305 310 315 320 325 330 340 345 355
ностоя разывающима все сидее чидее жана на состояностиција однака на какартистиска си деректира се кана на костояностиција однака на какартиски са канара однакара на карада какарања на какара се на искраја се се сиција на карада се карада на или са односна се сиција да и си и ја на карада на карада на какартика се си ција да какара се си карада на карада на какартика се си ција да карада на карада на карада на карада на си карада на карад	295 300 305 310 320 325 320 325 340 345 345 350 355 360
2 до слудителнициона респиратира с какана на состаностиција по права на какана си при не си прати и до се на на на состаностиција по права на какана си при не си состано на пратира на се на права со до права на си при ницира на пратира на пратира на се на на на какана си са прати на пратира на пратира на си какана на си си са прати на пратира на пратира на си какана на си си са прати на пратира на си си права пратира на си какана на си си са пратира на пратира на си какана на си си са пратира на си са какана си се си на су состо и состо и состо и соста пратира Асла ГАА (ПАПО) права прати на пратира на си се си на су состо и соста пратира на си са какана си на на систа на си какана си се си на су состо и соста состо соста соста пратира на си са какана си на на се са прада на си се си на да си се си на су состо соста соста состо соста соста пратира на си са какана си на на се са прада на си се си на какана си се си на су состо соста со	295 305 310 325 320 325 325 340 345 345 355 355 365
ностора за на концирна нести дестиде с за на насточности и и дирака на сакар у състосана да да да у насточности и и дирака на сакар у и състосана да у да у насточности и и и и са у и сиска са у и си у и и и и и са у и сиска са у и и и и и и и и и и и и и и и и и и	295 300 305 310 315 320 325 340 340 345 340 355 360 370
пос од да за концирана с си цре с на де как и и коссинос синици пос од да за концирана с си цре с на де как и и коссинос синици од си косода с со са и со до со	295 300 305 310 320 320 320 320 320 320 320 340 350 350 350 350 360 370
ностора развани и при на если де си из са на на насти и при на насти на при на насти на насти и при на насти на насти и при на насти на насти на насти и при на насти насти на насти насти на насти насти на насти на насти насти на насти насти насти насти насти на насти наст	295 300 305 310 325 320 325 340 345 355 360 365 365 365 370 375
настара за нали изръзва сси и респуря са на и цасстиностини у призаната си престата си престата си призаната са престата си призаната си престата си призаната си престата си призаната си престата си призаната	295 300 315 320 325 325 325 340 345 345 345 345 345 345 345 345 345 345
В стада за на клищина не спирае си уде за на на стинистичници призената си пристист са наје за одериница на на при раските са на си уди си си одери си се са наје за одериница на на при раските са на си уди си на се одириници си уде на при раските са на на на сисина си одириници си уде си на на на при раз раз одири ниса ди си на се са на на на сиси одири од раз на си на при раз раз уди уда на изреди се се си на да са ка на сисе си на едуресси са са са за ниси на иссе са на на сисе се ина едуресси на одири се одири уде уде си се за на сисе си на едуресси на на сисина и си си за да на и израчи одири са на си са са за ниси на иссе са рад са на и си рисе си на едурески на на са сисе са си ча оди са да са на си си си си на са на на на на на са сисе са си ча си са да са на си рисе си на са да оди на на на на на да на рици на са на си риси си са на на да рици на на на на на са на си са на си на си са на на си си си на на на на на на на са на са са на раз на на си си си са на на на на на на на на на на на си на си си рисе на на на на на на на на на на н	295 300 305 310 325 320 325 345 345 345 345 345 345 345 345 345 34
ностоя разывалищины ассициресчира сайза ць ссчиностицир права цая акцаристиста сайза организация правание сая спорта саяра саяристиста сайза организация саяриа на спорта саяра саяристиста сайза организация саяриа на настоя саяра саяристира саяристира саяристира саяриа на настоя саяристира саяриста саяриста саяристира саярист настоя саяристира саяриста саяристира саяристира сарист настоя саяристира саяриста саяристира саяристира сарист настоя саяристира саяриста саяристира саяристира сарист настоя саяристира саяриста саяристира саристира сарист настоя саяристира саяристира саяристира саристира сарист настоя саяристира саяриста саяристира саристира саярист настоя саяристира саяриста саяристира саяристира саярист настоя саяристира саяристира саяристира саярист настоя саяристира саяристира саяристира саяриста и саяристира саяристира саяристира саристира саярист настоя саяристира саяристира саяристира саристира саярист настоя саяристира саяристира саяристира саярист настоя саяристира саяристира саяриста саярист настоя саяристира саяристира саяристарии саяристира с уписанизации саяристари сира саярии сарии саярии саярии настоя саяристира саяристира саярии саярии саярии настоя саяристира саяристира саярии саярии саярии саяристира уписани саяристари саяристира саярии саярии саяристира настоя саяристира саяристира саярии саярии саяристира настоя саяристира саяристира саярии саярии саяристира со созращении на настоя саяристира саяристира саярии заяриа саяристира со созращении на настоя саяристира саяристира саярии саярии саяристира со созращения на настоя саяристира саяристира саярии саярии саяристира со созращения на настоя саяристира саяристира саярии саярии настоя со созращие саярие саярии с	295 300 310 310 315 325 340 345 340 355 340 355 360 375 375 375 380 375 380 375 380 375 380
честа развальнирныя ссицаетира сами и исстинстинирни правание и правание правание и правание и правание и правание правание правание и прав	1 295 300 310 315 310 315 325 330 355 340 355 355 365 375 365 375 380 300 375 300 375 300 390 300 390
	1 295 300 305 310 315 320 315 321 325 325 335 335 350 335 350 335 350 340 350 350 350 360 365 360 375 360 365 375 360 385 385 395 395 395 395
настара за нали изръзва сси и респуряе за на цъсси изси и изразва на клидина на сели у сели за настара на кака и споре сели изразва на кака иза кака кака иза кака кака иза кака как	1 295 3 300 3 310 1 310 1 311 1 320 1 321 1 321 1 325 1 325 1 325 1 330 1 325 1 355 1 355 1 355 1 355 1 350 1 360 1 355 1 3705 1 380 1 380 1 390 1 390 1 390 1 390 1 390 1 390 1 390 1 390
	1 295 3 300 3 310 3 310 3 310 3 310 3 310 3 310 3 310 3 310 3 310 3 310 3 310 3 325 3 300 3 <t< td=""></t<>
настара за на почрны в ссидествует а на и цесточностичира праванаето простока и праванаето прав	1 295 300 305 310 315 320 335 335 335 345 355 361 355 361 365 365 370 365 370 365 370 365 370 365 370 365 370 365 370 365 370 365 390 390 345 390 345 390 345 390 345 390 345 390 345 390 345 390 345 390 340 390 340 390 340 390 340 390 340 340 340
настара за нали изръзва сси и респуряения за иссочностини у правана на простоска и на правана на споресостивни на правана на споресостивни на правана на споресостивни на правана на споресостивни на правана	1 295 300 310 1 312 1 320 1 320 1 320 1 320 1 320 1 320 1 320 1 320 1 320 1 320 1 335 1 340 1 350 1 365 1 370 1 365 1 370 1 365 1 370 1 390 1 395 1 405 1 405
	1 295 300 300 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 320 320 355 340 355 355 355 365 365 365 375 365 375 365 375 365 375 365 375 365 375 365 375 375 385 390 395 390 400 400 400 401 410 402 420
	1 295 300 300 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 320 310 320 310 330 335 335 355 355 360 355 370 355 370 355 370 355 370 355 370 355 370 355 370 355 370 355 370 355 370 355 370 355 370 355 370 355 370 355 370 355
A set of the set of	1 295 300 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 320 330 330 335 330 335 355 350 350 350 350 350 350 350 350 350 350 350 350 350 350 350 350 350 350 350 350 350 350 350 350 350 350 350 350 350 350 350 350 350 350
	1 295 300 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 320 355 355 350 355 350 355 350 355 350 355 350 355 350 355 350 355 350 355 350 355 350 355 350 355 350 355 350 355 350 355 350 355 350 355 350 355 350 355 350 355
настара за на ни изръзва сси и респурта чан и цъсствиности и изразва на клидина и спорта сси израз на какато си престата и израз на какато си израз на какато на какато и какато си израз на какато на какато и какат	1 295 300 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 310 330 310 330 310 330 310 330 310 330 310 330 310 330 310 330 310 330 310 330 310 330 310 330 310 330 310 330 310 330 310 330 310 330 310
	1 295 300 315 310 315 310 315 310 315 310 315 310 310 311 325 320 310 310 310 310 310 310 325 323 330 323 330 323 345 345 345 345 345 345 345 345 345 345 345 345 345 345 345 345 345 345 340 350 350 365 360 375 365 385 375 395 400 344 405 344 425 37 435 37 435 37
	1 295 300 310 310 315 325 325 1 325 1 325 1 325 1 325 1 325 1 325 1 325 1 325 1 325 1 325 1 345 1 345 1 345 1 345 1 345 1 345 1 345 1 345 1 345 1 345 1 345 1 345 1 345 1 345 1 405 1 425 1 425 1 440
ne congrana anu un you ka cuu yo cuy sa cuy sa uu cu cuu uu yo guyaaa ua ka uu you ka cuu yo cuy sa uu yo yo ka uu yo yo ka uu yo yo uu cu you uu cu kuu yo	1 295 300 305 305 310 310 312 310 323 323 323 323 325 323 335 325 335 325 335 325 335 325 335 335 335 335 3365 3365 3365 335 335 335 3355 335 340 335 345 345 345 335 345 335 345 335 345 345 345 345 345 345 345 345 345 345 345 345 345 345 345 345 345 345 345 345 345 345
	1 2 3 3 300 3 300 3 300 3 300 3 300 3 300 3 315 3 315 3 315 3 315 3 315 3 305 1 325 335 340 1 325 3 340 1 345 3 365 1 365 3 365 1 365 3 365 1 365 3 365 1 365 3 390 1 395 3 390 1 395 4 400 1 4 4 4 1 4 4 4 1 4 4 4 1 4 4 4 1 4 4 4 <t< td=""></t<>

	AAGAUAUGUCCAAUAUGUCCCGgucccgguaaaugacuacuuuaucuuua	
	2.5.5.51111.011.511.5.05.5.5.05.01111.05.5.51111111.0.511.0111111.0.05.0.0.05.11.011.0	150
	auauuuguuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuu	200
		250
	uaycayauycyyauyuacauaucaucyaacccucaauyyayyacauyuua	200
		250
	ucuyyauaayauuucyuyyyayaccyuyacuyyaaauycaauayauyyuy	400
	cuyacceaauaccaaccuuaayyaccyuaayyyayuauuuyuuycuyaa	400
	cuuaccaucacyuauyaayaauyyauaaayyycaccacyuuuyucuycaa	500
	yyuyyaacadaaayaduyyaugyayeeacddaaaaaadeecdaccaaayya	550
	uuaauyyuaayaaucuauyyaycaauuyuucaaaaccuyuuuucaauucc	600
	actugucaugecaucaacacgugudadedddddgdgdaddadguageag	600
	ggauuuucuucuuuaguucuucuaucuguggeeagageeeuaauuguucu	700
	uccccuayaacauacuaaaaaagacacyyuyacccuyacuugcuuayuya	000
	aagacuucuaccegaagdaugugudugggeuuggeuegdugaugaucug	000
	gaaucayyeuuacaauacaacaccacaayeecuuaaagaaaaccayyyauc	0.00
	cuaucuycuuaugyccaguuaacucucagccuugaacagugyaacgaca	900
	augucucuguguuuugcuguguuuuccuugugucuuuggacuuuugaaagaac	1000
	caaccuggucaaccucaacaugaacauccoccgauacgugucaagguccaca	
Durch de sub de la construction de la grunda de la construction 1200 un production de la construction de la grunda	auuagaugugauucugugucacugugucuucggcuguuuguu	1100
	uuugugcuuguuauaucacauuguguuugucguuuuaaugcagauucaaa	1150
ugucuuuauuauuauuaauuaaguungaucucauguuuaauuuaa	auaaaaaaaucucuuuqcaacucaquuquuquauqucqcauqcuquuua	1200
ujuqa aguca aguguca cauga aguca aguca agua agu	ugucuuuauuauucaauauuaguuugaucuccauguuuaucauacuuuaa	
ccqpuruquuaqqaqqaqauuaqaanqacaaguuqacaqauuquuquuquuaqacaquuquuquuquaqqaqauquuquuquuquaqqaqauquuqu	guguagagucacagugcuccccuaaugcaacacacauuagguuaagccau	1300
accasacura ang aka gasa succasuu guu suu guu suu guu suu suu gasa gasa	ccguguguuaagcagugauuaaaauagaucaaauuuaacaacaucaccuc	1350
	acaaaaucuaaugaagaaaaucuauuuguuuauuguuuuuuuguauacaua	1400
cuggyocuug ag cog ac aa ag cog aa ag ac aa u ag ag cog ag u ag ag ag cog ag u ag	guauuaccauuguuugugugacuugucuuugucuacguguguuucuacua	1450
caque ou su grue casu sa grae au ue caque ue caque ue grae au cas grae au caque grae au cas grae au ca	cugggucuugcagcccgacauaagacaaauaguuauucacggccaaauuc	
 cacauaa ag og grucowucaa ag oca aw ucaag aw cau yu ag ga waac aw yu ag ga waac aw uu ag og aw cacau wu ag ga waac aw uu ag ag waa aw yu ag aw ag waac aw uu ag ag waa aw yu ag aw ag waa aw yu ag aw ag waa aw yu ag aw	cagcucuauggucaaauaaugaauugacugauucacaagccaggucaugg	
	cacauaaaggggucuuucaaaagcaauucaagaucauuguaggaugacuu	1600
 Bacaba ang cababa ang balana ang bang ang balana ang	uaauuaucauaaucaauuuuagugggaccuuuageecagecuuuuacacu	1650
	uacaauaaugcauacaguuacauuauuuaaauuuguaguuaaacuuggau	1700
 Marcha Sacka Sack	ugacugccauugauuuaccguaguuucacacugaccugagguuauuaagc	1000
	gugggggggggggagggaagugauuaugauaugguaaucaucucaugagcuauauu	1000
	geaucugcauuaaaacgacaaacacaaugugauauaacaagcacaaacau	1000
	aaaccuudcacquauccadagauduucauduudaaccadquudduu	1950
	gggeeaageaeggaageegggaagaacaagaaggaaggaa	
	uuugaccauagacucaugguaaacaacagcuauacacagugucauugu	2050
	cquuccacuquucaaqqcuqaqaquuaacuqqccauaaqcaqaauaqqau	2100
autoritical e canadica esto canadica esta discuturizità di autorità	cccuqquuuucuauaqqqcuuquququuquauuquaaqccuqauuccuq	2150
	aucaucaacaagccaagccacaaacacauacuucggguagaagucuuuua	2200
agata was ac an uga uga og uga uga uga uga uga uga agata agata agata casau ugg uga uga uga uga uga uga uga uga u	cuaagcaagucagggucaccauuucuuuuuuaguauguucuaggggaggu	2250
	agcauaaacacugauggacgcugagucguuccuccugcaagcauuagaga	2300
	acaauuagggcucuggccacagauagacgaacuaaagaagaaaaucccug	2350
autopasaicauguuutopaseautopuutopuutaeauto 2450 autopasaicauguutopuutaeteautopuutopuutaeteautopuutopuutopuutopuutopuutopuutopuutop	cuacauaauacacaaaaaaaaaacacguguuugauggcaugacaagagga	2400
biudguaggiucunguaggugeeneduceeuus 2 255 egga saa curuugueeuus gugeeneduceeuus 2 255 egga saa curuudeeuus 2 255 egga saa curuugeeuus 2 255 egga saa curuugeeuus 2 255 egga saa curuugeeuus 2 250 egga curuuguuuguuuus eggueeuus agga ceacuruus agga curuuus 2 250 uucee seeuus egge curuus aggueeuus acuruu 2 250 egga curuudgu aguuguuuus eggueeueus acuruu 2 200 egga curuudgu aguuguuuus eggueeueus acuruu 2 200 egga agueegga curuuga auuguugu aguugu aguug	auugaaaacauguuuugagcaauugcuccauagauucuuaccauuaauuc	2450
caga saa cuu gugo cou u au cou u au cou au cou ga sagu ga sagu waga sa cuu gugo cou u au cou au cou gu ga sagu u au co agu u coo gu ga sagu u au cou gu ga cou gu ga sagu u au cou gu ga cou gu ga sagu u au cou gu ga sagu u au ga sagu cuu ga gu gu ga sagu u au cou gu ga sagu u au ga sagu cuu ga gu gu ga sagu ga sag	uuugguagggucuuguaaguggcuccauccaaucuuuauguuccaccuug	2500
	cag <u>acaaacuuggugcccuuuauccauucuucauacgugaug</u> guaaguuc	2550
caaquuiugaauucagauucagauucagaaucagaaaucuuaucagagau tasi qayuuiguaacagauugacuugacuugaaucagauucagaaaucuuaucagagau caqaquuuuuguuuaguuuaguuuaguuuguuaguuuagu	agcauuaauacuceeguaaggueeucaagguugguaauugggueageae	2600
aquuquuquad actuag casa ata ac equucequququ aguuquad ata ata ac 215 aquoq concerta ang ago aguuqua ata agua canu cuququ aguuquad ata ata ac 215 ac agu quuquuqu agu aguuqua ata agua canu cuququ aguuquad ata ata ac 215 ac agu quuquuqu agu aguuquad agu agu agua cucu asa cuu agu agu 210 ac agu quuquuqu agu agu agu agu agu agu agu agu agu ag	caaguauuggauuuccagucucggucucccacgaaaucuuauccagagau	2650
catagiocciccia and paga pulsa	aguuuguuaaceuugaeuugaeaauauaeeguueeuguguguguaauaa	0700
uncession uncession <t< td=""><td></td><td>2700</td></t<>		2700
Collinaalueenuk galagalueen julkaa jugapapola julka kuulaka galagalueen julkaa jugapapola julkaa kuulaka galagalueen julkaa jugapapola julkaa julk	caugeceuceauugaggguuugaugauauguaeaucugeaucugeuaeag	2700 2750 2800
uuccascuugeng ACAAACUUSUIUUCUUUUGUCAUUCCAAACAUUUGA, AUUUGA suuccascuugeng ACAAACUUSUIUUCUUUUGUCAUUUGUCAUUUCAAUUUGUUUU uuccasgaauauuuguuuaccauuuggucuuccauuuguuuu uuccasgaauauuuguuuaccauuugauuuccauuuguuuugu	caugeceuceauugaggguuugaugauauguaeaueugeaueugeuaeag gaeaaueugugeegeeuuuuuaaaugaggaeaeagugaagaauuaueeu acgaauuuuugaugaugagaeaeaguuuuueeaueuu	2700 2750 2800 2850
UGgia ang uncag cauca saus cucculus og processi ang guia paga saca quanti gau uncag uncag que uncasa saus cucces causa saus cucculus que traditiones and saus saus culos causa saus culos causa saus culos causa saus culos que traditiones and saus saus saus culos que traditiones and saus saus saus saus saus saus saus sau	caugeceueeauugaggguuugaugauauguaeaueugeaueugeueeag gacaaueugugeegeeuuuuuuaaaugaggaeaeagugaagaauuaueeu aegguguuuuguauguuuuaegueauguaggaggaguuuuueagueuua ceauuaaueeuuuggagaueuumaaaugaggagguuuueaueuuuaue	2700 2750 2800 2850 2900
aggia ag caeca ag ua ung au une ca guar deg pue ucce a sa au au ga a sa au	caugoccucoauugagguuugaugauaguacaucugcaucugcucoaag gacaaucugugocgccuuuuuaaaugaggacacagugaagaauauccu acgaguguuuugaauguuuacgucayuaggagagaguuuuuccaucuaac ccauuaauccuugaggaagaucuuguaaguggugucaucuaaucuuuaug uuccaccuugaagcaaacuiiigsiigiinciiiigiiicaaliigea GAcailisiia	2700 2750 2800 2850 2900 2950
úřeca gradna ulu gruna čecu ja celu je celu je ulu grad na ka če ulu je celu je ulu grad na ka če ulu je celu je ulu je uluu je ulu je ulu je ulu je ulu je	caugoccuccauyaggguuugaugauaguacaucugcaucugcaucugcaucug gacaaucugugcogccuuuuuaaaugaggacacaguagaaga acgaquguuuuguauuuaagucauguagaagaguuuuucagucuua ccauaaaucuuuggaagaacuuguaagugguaguacucuaaucuuaaug uuceaccuuggaagAbAACUUGGUBUCUCUUCCNUCCACACACUCUGA UGrauaamugaagaucaaaucucucuugaagugacoccuuaaguguaau	2700 2750 2800 2850 2900 2950 3000
gugua kuisa caugu circu cau ugi aggu uu ga ya ua guga cau cacia u uu cau cau agu circu cau ugi aggu uu ga ya uu ga ya cau guga ca say aga au uu cau cau agu ya uu uu gu au yu uu uu agu cau uu gu ga ya	саму состисских правудации да мара мариа сами си усла на си усла да да си из супара со селита на супара да си из супара да супара си из си из си из си из си из супара да си из супара си си из си супара да си из си из си из си си из си супара си си из си	2700 2750 2800 2850 2900 2950 3000 3050
cugcuacaggacaaucuguccgccuuuuuaaaugagacacagyaag 200 aauuacuuacaguguuuuguccgcuuguuuacguccguugagagaguu 225 uucagucuuaccauuguucuguauguuuacgucuugaagugugagagaguu 200 uucagucuuaccauuguucaggaucaauuguuuguugucuguugagagaguu 200 uucaguuucagucagausgauuguuuguuucuguuuguuguuuguuuguuu 200 uuguguuuuguuucaguucuguuuuguuuguuuuuauuuuuuauuuucugu 200 uuuuuacauuuguuucaguucuguucugauuguuuuaauuuuuauuuu 200 uuuuuaauuuguuucaguucuguucugauuguuuuaauuuuuauuuu 200 uuuuuaauuuguuucaguucuguucugauuguuuuaauuuuuauuuu 200 uuuuuaauuuguuusagauucuguuugauguuuuauuuuuauuuuu 200 uuuuuuaauuuguuusaguucuguucugauuguuuuauuuuuuuu 200 uuuuuuaauuguuusaguucuguucuguuuguuguuuuauuuuuu 200 aauugucuauuguuusaguucuguucuguuuguuguuuuauuuuuu 200 aauugucuuusgauuusagauuguuacauuuguuguuguuuauuuuu 200 aauugucuuuguuusaguucuguusguuguuguuusa 200 uuuuuuuaauuguuusaguucuguusguusgauusa 200 aauugucuuuguuusaguusagauuguusgauusa 200 aauugucuuuguuusaguuusgauuguusgauguusa 200 aauugucuuuuguuusguuusgauuguusgauguusgauusa 200 uuuuuuuusasagauugaacaacag 200 uuuuuuuusauuguuusaguuuguuuuuuuuuuuuuuuu	eaugo-coucoa una jagguunga u paraa u paraa cau cu po acu su po a go aau ucu po po ce cu u u u aa aau a go aa acu aau cu a a co aa u pu u u u paraa go aa acu aau cu a a co aa u pu u u u aa acu aa u aa acu aa acu aa acu aa acu aa acu aa u u co aa cu aa acu aa aa acu cu aa acu aa acu aa acu aa acu aa go aa acu aa acu aa aa acu cu aa acu aa acu aa acu aa acu aa go aa acu aa acu aa aa acu cu aa acu aa acu aa acu aa acu aa go aa acu aa acu aa aa acu cu aa acu aa acu aa acu aa acu aa go aa acu aa aa acu aa aa acu acu aa acu aa acu aa acu aa acu aa go aa acu aa acu aa aa acu acu aa acu aa acu aa acu aa acu aa acu aa go aa aca aca aa aa acu aa aa acu aa acu aa aca aa aa acu u aca acu aa acu	2700 2750 2800 2850 2900 2950 3000 3050 3100
aautua cuutuk cuu gu uu uu gu uu uu gu uu uu gu uu uu gu uu u	саидо сосисосанија ја друшија ана из цика си си средски су си са друга де са ан су су друго су си цика за друга са друга друга други за су друга други су су си си си си су су су су си си си си су	2700 2750 2800 2850 2900 2950 3000 3050 3100 3150
uucaquecuuaceauusquuaqaauuquaaquojuigciacuuq 300 auccuuaqueceacuuqaaquojaquaquacuuquaaquojuigciacuuq 300 auccuuaqueceacuuqaaquecuuqaaquecuuquaaqueciguecoguecogu 335 ACAIACACG, Biguasquucaqcaaucaeuuqaacuucaquucaguecoguecoguecoguecoguecoguecoguecogueco	caugo couco canuga aggunuga ua ua ugu cau cau cago couco agu ga caa au cugu cogo coucuna ua agu aga aga caa cagu agu aga au ua ua cou a caga gunu ugu au ugu unu ag cu cagu aga ga gunu ugu agu unu ga cau ua au cou ugu aga ga cu ugu aga ugu aga ugu agu agu agu uu caa cou ugo ag ACAACUUGOI UUCCUI UUCCUI COUCOCACAAUSICA UGga agu caga cau caa au au cu cu cu ag ga cu cu agu agu agu agu cag aga au au ugu uga cu uga cau aga agu cu uga cau aga agu gu ga aa au ag uga cu uga cau aga au cu uga cau aga agu agu agu au cag aga au au ugu uga cu uga cau aga accuu uu cu uu ugu gu ga aa au ag uga cu uga caa au aga cu uu cau agu aga caa agu aga u cag aga au agu gu cu caa au agu ag caa agu aga ag u cug caa aga aa au cugu ag cocuu uu uu aga aga aa aga caa agu aga au cag aga au aga cuu gu ag caa au aga ga caa agu aga aga aga aga aga aga aga aga a	2700 2750 2800 2850 2900 2950 3000 3050 3100 3150 3200
aaaccuuuuuuuuuuaccaccuugaaArAAAcuUUUUucacuucauuuuuuuuuuuuacaccacuuugaaArAAAcuUUUUUucauucauucauuucauuucauuucauuuc	саизоссиссалирардиницализицисалисировисировиси десалисчиросуссининизациардалеалириардализицист асрафиницининизационардалеалириардалеалиристи асрафиницининушинарцисалириардардардиницинисти исрафаницининушинарцисалириардардардинини исранаршинарданизацининардисалиристинардинини дириализасалириарданистинардиниринали аносарданалицинисти адиниструпносовалаласисицини инисрафанизацисиралистинардиниринали аносарданалицинистинистинардиниринали сицирализасалиристиристинардиниринали сицирализасалиристиристини сицирализасалиристиристини сицирализасалиристиристини сицирализасалиристиристиристини сицирализасалиристиристини сицирализасалиристиристини сицирализасалиристиристини сицирализасалиристиристиристини сицирализасалиристиристини сицирализасалиристиристини сицирализасалиристини сицирализасалиристиристини сицирализасалиристини сицирализасалиристини сицирализасалиристиристини сицирализасалиристини сициралиристини сицирализ	2700 2750 2800 2900 2950 3000 3050 3150 3220 3250
ACAI/ACAIOQ Megina gueca general casa use december subject to the subject of	caugo-coucoa ungaggguunga unga unga unga unga unga	2700 2750 2850 2950 3000 3050 3100 3150 3220 3250 3300
guarg juacet goulde g	саидо сосисосали за разлици за накущаса и спрокиторовита, а срад разлики у сима и разлики у самоторовита, а срад разлики у пакада с самоторовита, а срад разлики у пакада с самоторовита, и после селица с а у СААС Оборовита, и после селица с а у СААС Оборовита, и после селица с а у СААС Оборовита, и после самоторовита, а составание и у СААС Оборовита, и после самоторовита, а составание и у СААС Оборовита, и после самоторовита, и после самоторовита, и после самоторовита, и после самоторовита, и после и у СААС Оборовита, и после и и с самоторовита, и после и и с с самоторовита, и после и и с с самоторовита, и с с с си и с с самоторовита, и с с с с и и с с с си и с с с с с с с	2700 2750 2850 2950 3000 3050 3100 3150 3220 3250 3350 3350
асаяанисциае севудание дишуциае сощае сищае саманаес 3800 динсе из учружурина на как очу уческое са ишуа учружури за изуала 3850 и акти се как из органа у ак как очу уческое са ишуа учружури за изуала 3850 и акти се как из органа у ак как очу уческое са ишуа учружури за изуала 3850 и акти се как из органа учружури учружури за изуала 3850 учружури учружури		2700 2750 2800 2950 3000 3050 3100 3150 3200 3250 3300 3350 3400
guiceougougougouanaecaugueccuccaugaoguugougaugaugaanaecaugaoguugougougaugaoguaecaugaecaugougougougougaugaecucagaocoguecoguecaugaecaugaega 3800 acacocaugougougougaugaecucagaocoguecoguucoguugaugaugaecucaga 3800 acacocaugougougougaugaecucagaugougaugaecucaga 3800 acacocaugougougougaugaecucagaugougaugaecucaga 3800 acacoguugaugaugaecucagauguecucaugaugaecucagaugaecucagaugaecucagauguecucaugauguecucaugauguecucaugauguecucaugauguecucaugauguecucaugauguecucaugauguecucaugauguecucaugauguecucauguauguecucaugauguecucaugauguecucaugauguecucaugauguecucaugauguecucagecucaugagecuugaecucagagecucagaecucagagecucagagecucagaecucagagecucagagecucagaecucagagecucagagecucagaecuugagecuugaecucagecaugagecuugaecucagecaugagecuugaecuugagecuugaecuugagecuugagecuugagecuugagecuugagecuugagecuugagecuugagecuugagecuugagecuugagecuugagecuugagecuugagaecuugagaugaecuugagaugaga	саизо-сосисосали за разриши за изациа са иси рокистурования деса на иси удере се иси или иза на изи раз на са изи раз да или все и а срад изи и изи или изи на средска уда за раз ди или се и са изи вале си или изи уда на си или иза уда за уда и или се и или са все или раз е да иси или за уда уда и или или или или или или или или или	2700 2750 2800 2950 3000 3050 3100 3150 3200 3250 3300 3350 3400 3450
	caugo couco cau ya agguu ya ua ya ua ya ya cau ya ya o ya	2700 2750 2800 2950 3050 3150 3250 33250 3350 3400 3450 3500
	саизо-сосисосали раздури инда и акции сали си рокистуровала а сради у индуктирани у индуктирани и	2700 2750 2800 2950 3050 3050 3150 3250 3350 3400 3450 3500 3550
на дра арцилисари со цирорсни с на не со принискати и не се на и и и и и и и и и и и и и и и и и и и	caugo couco cau ya agguu ya u au ya u au ya cau cau ya okau ya wa ya wa ya wa ya wa ya ya kau ya ya wa ya	2700 2750 2850 2900 3050 3100 3150 3250 3350 3400 3450 3550 3550 3600
utualities a tabuju du superioritis and superioritis a	caugo couco cau ya agguu ya au au ya u au ya au au ya ya au au ya ya au au ya ya ya au ya	2700 2750 2800 2950 2950 3050 3100 3150 3250 3250 3350 3400 3550 3550 3550 3600
ала иристилирала шала вирдии драмастиналарирна радисас 195 аристисти и ставити и ста	саизососиссали за адушица за вызрасали с зроски су осисло де са але счуд осу ос сили и на адуа са са зрад за да за иза кос а су адушица за пушица су са са зрад за да зрад за сили са су адушица за пушица су са са зрад за да за иза кос и су са сили су са сили за сили за сили за сили за сили за сили и су са сили су са сила за на сили за сили за сили за сили за сили за сили и су са сили су са сила за на сили за сили са сили са за сили са сили са за сили за сили за сили за сили за сили за сили си сили са за сили за сили си сили сили за сили за сили за сили за сили са сили са за сили са сили за сили за сили за сили за сили сили за сили са сили сили за сили са сили за с	2700 2750 2850 2950 3000 3050 3100 3250 3250 3250 3400 3450 3550 3550 3600 3650 3770
а протративности протранование протрана и протрани и протраните п	caugo couco cau ya agguu ya au au ya ua ya ya cau ya oka ya	2700 2750 2850 2950 3000 3100 3150 3220 33100 3450 3450 3450 3550 3650 3650 37750 37750
conjoganua na ud gu uca nu udu uka caka cun se cura caka da udu uka gu uca nu gu uca nu gu uca nu se cun se cura caka da uka gu uka nu gu uka udu uka nu gu uka nu se cun se c		2700 2750 2850 2950 3000 3150 3250 3250 3350 3450 3450 3550 3550 3550 3550 35
а а ја ала и сили и јуши и и јули ала слакурали и секлира (100 и и и у и у и јуши јуши и и и и и и и и и и у и у и и и и и	caugo couco cau ya agguu ya au au au au ya ya au au ya ya au au ya ya au au ya ya ya au ya	2700 2750 2850 2900 2950 3050 3150 3150 3250 3350 3450 3550 3550 3650 3650 3700 3750 3800 3800 3800
шир учидае синденсий учистые сучир учистве синстру дуружите до сосрасаваюте астависае сросаваются сосраствания учистве составая у актидает и учистве составая у учистве и саятима учистве саяти саята и слидуи учиствания составая учистве и саятима учир учистве составая составая учиствания составая и саятима учир учистве составая учиствания и саятима учир учистве составая учиствания и составая учистве составая учиствания учир учир учистве составая учистве учир учир учистве составая учистве учир учир учистве составая учир составая учир учистве учир учир учир учистве учир составая учир учир учистве учистве учир учи		2700 2750 2850 2950 3050 3150 3150 3200 3350 3300 3450 3550 3600 3650 3600 3650 3700 3850 3800 3800 3800 3950
досодаскивая салавидушали со соросовали иссе орбитовинуща 100 салавианизация спранисае аркосавали со орбитование салавиания истиносава орбание салависали у продидает инивализация сало и салашива у у у у у у у у у у у у у у у у у у у		2700 2750 2850 2950 2950 3050 3150 3150 3250 3350 3350 3450 3550 3550 3550 3550 3600 3550 3600 3550 3600 3550 3600 3750 3800 3850 3950 4001
саалыачдаашдасцаяцисасаадосадросандросандаадорд 115 исилиисааладогалисаадисандиунарадидасникалицаяция 4200 исалишиадидардоссициядосодостаностикалицаеция 4200 исалишиадидардоссициядосодостикалицаеция 4200 акции социалициисаециядицияалециядидардорд 4300 ишиди содиалициисаециядициялаециядидициялардорд 4300 ишиди содиалициядидиалециядициялаециядидардорд 4300 ишиди содиалициядидиалецияли социалециясы 4500 содаслигисаедиадиалисание содиассислование 4500 содаслигисаедиадиалециясы содиассистование 4500 содаслигисаедиадиалециясы 4500 содаслигисаедиадиалециясы 4500 содаслигисаедиадиалециясы 4500 содаслигисаециясынаетование 4500 содаслигисаециясынаетование 4500 содаслигисаециясынаетование 4500 содаслигисаециясынаетование 4500 содаслигисаециясынаетование 4500 содаслигисаециясынаетование 4500 содаслигисаециясынаетование 4500 содаслигисаетование 4500 содасливноетование 4500 содасливноетован		2700 2750 2800 2950 2950 3000 3150 3100 3150 3250 3450 3450 3550 3550 3600 3750 3750 37750 3800 37750 3800 3950 4000
иснию саваарсавие сарансалирия разирасникания исника искании заринасания ании уларания синосаная зароза и асаринасания иниска акии уларания синорали уларания ании ас егуарание са все из асстоя удара сундуара удара арида и и и уларание уларания и и уларания и уларания совас лиговская и объектов и и и и и и и и и и и и и и и и и и и		2700 2750 2850 2950 2950 2950 3050 3150 3250 3250 3350 3450 3450 3450 3450 3650 3650 3650 3650 3650 3650 3650 36
исаличинарирдаесициарсесарссилицасасни салшаеаны рад и салдинаелизи иналаличирациаласни радинарски радинарски ации сириаричи сассираесираринаяси радинарску радинарску адира иниарски радинаринаели сирарска радини иниарску адира иниарска радинаринае инистрикае и салабот (САССКА) иниарска радинаети и сирарска радинарски радинарски с содаели сассаваети салабот сирарска радинаети с содаели сассаваети салабот сирарска радинаети с содаели сассаваети сассаваети с содаесо и соста с содаели сассаваети сассаваети сираети с содаели сассаваети сассаваети с содаети с содаети с содаели сассаваети сассаваети с содаети с с с с с с с с с с с с с с с с с с с		2700 2750 2800 2950 2950 3050 3100 3150 3250 33100 3350 3450 3550 3550 3650 3750 3650 3770 3800 3800 3950 4000 4000 4150
иасаринасаниацияалинарианаскиндранирасчусскинд 300 анинасчушариниссаесчудаснодаринаниарасундэрдэрдэд 335 адираницандаандунаансансискондарсинаснударидариадаридэрдэ инирисардасниканианиданасностоянароссиластрукти соваслиговасаласаналисалистриалиструктир Совасилиструктиралиструктир Совасили совасили со совасили совасили сов Совасили совасили сов Совасили совасили совасили совасили совасили совасили совасили совасили совасили совасили Совасили совасили сов Совасили соваси		2700 2750 2800 2800 2800 3050 3050 3150 3150 3250 3350 3400 3550 3550 3550 3550 3600 3550 3700 3750 3800 3950 4000 4050 4050 4150 4150
аиша счуцадицисасасида сеца душа иша ад суцодуда додуа. 4350 ауџа ациа удиа издуша адса сиска сиза удела суци удиа удиа удиа удиа удиа удиа удиа уди		2700 2750 2800 2950 3050 3050 3100 3150 3250 3350 3450 3450 3550 3600 3550 3600 3650 3750 3850 3850 3950 4020 4050 4100 4120
agugaubaugaubauguabacaucucaugagcuacuguubabagcuggg 4400 uuugucaggcaubaauugabucauucuguacauccagACUCCAACCAAA 4450 CGGACAUGACAAGAAGGUGGAAGGADAUGACAUGGGAUACACAGAGGUA 4500 GAAGAAGAUAACAUGGGAAGCACAGCCAUCACCUUCAUCUUUCUU		2700 2750 2800 2800 2950 3050 3150 3150 3250 3300 3350 3450 3550 3650 3650 3650 3650 3750 3850 3850 3990 4050 4050 4050 4050 4050 4050 4050 4
uuugucaggcauuaauugaaucauuucuguacauccagACUCCAACCAAA 4450 CGGACAUUGACAAGAAGGUAGAAGGAUAUGACAUGGGAUACACAGAGGUA 4500 GAAGAAGAUAACAUGGGAAGCACAGCCAUCACCUUCAUCCUUCUUUCU		2700 2750 2850 2900 2950 3000 3150 3250 3300 3450 3450 3450 3550 3450 3650 3700 3950 4000 3950 4000 4050 4150 4150 4250 4300 4350
CGGACAUUGACAAGAAGGQUAGAAGGAUAUGACAUGGGAUACACAGAGGUA 4500 GAAGAAGAUAACAUGGGAAGCACAGCCAUCACCUUCAUCCUUCCU		2700 2750 2850 2950 3050 3150 3150 3220 3350 3350 3550 3550 3550 3750 3750 375
GANGAGAGAGAGGAAGCACAGCCAUCACCUUCAUCCUUCUUCUUCUUCUUCUUCUU 4550		2700 2750 2850 2900 2950 3100 3150 3120 3250 3300 3550 3550 3550 3550 3550 3600 3550 3600 3550 3600 3550 3600 3650 3600 4050 4050 4150 4150 4250 4200 4250 4200 4350 4050 4150 4150 4150 4150 4150 4150 41
		2700 2750 2750 2850 2950 3050 3100 3150 3250 33200 33500 33500 3450 3650 3650 3650 3650 3650 3650 3650 36

Different pairing of anti-parallel regions of Antarctic teleost pre-mRNA at different temperatures



 $\Delta G^{0^{\circ}C} = -3835$ Kcal/mol

 $\Delta G^{25^{\circ}C} = -2443 \text{ Kcal/mol}$

The Antarctic teleost Ig splicing is driven by the temperature dependent pre-mRNA secondary structure



Conclusions

The structures of the Ig pre-mRNA computationally predicted, are in good agreement with those experimentally observed.

The predicted RNA structures as well as those experimentally observed show a strict dependence on the temperature.

The atypical Antarctic teleost Ig splicing is driven by the physiological temperature.