

Protokoll Versuch D1

Strukturaufklärung einer Nitrogenase
durch Molekularen Ersatz

Gruppe 8

Susanne Duncker und Friedrich Hahn

Versuch D1: Strukturaufklärung einer Nitrogenase durch Molekularen Ersatz

Einleitung

Will man die Struktur eines Proteins mittels Röntgendiffraktion bestimmen stößt man unweigerlich auf das Phasenproblem. Dieses entsteht dadurch dass man als Abbildung auf dem Röntgenschirm Reflexe bekommt deren h , k , l -Werte und Amplitude man bestimmen kann, aber nicht die für die Fouriersynthese notwendige Phase der Reflexe. Diese lässt sich nur bei kleinen Molekülen gut bestimmen. Um das Phasenproblem bei Proteinen zu lösen gibt es mehrere Ansätze. Bei dem hier verwendeten sogenannten Molekularen Ersatz werden die Phasen eines ähnlichen Proteins, das sogenannte Suchmodell, dessen Struktur bereits gelöst ist, verwendet. Suchmodell und Zielstruktur müssen zunächst nun zur Deckung gebracht werden. Dazu wird bei beiden eine Pattersonsummation durchgeführt, welche die Differenzvektoren zwischen den Atomen wiedergibt. Die Formel dazu lässt erkennen, dass hierfür die Phase nicht bekannt sein muss. Für die Pattersonsummation des Suchmodells wird das Molekül in eine artifizielle Zelle gepackt. Daraus lässt sich bei Proteinen nach kein Strukturmodell erstellen. Die beiden Pattersonsummationen werden verwendet um die Orientierung der beiden Moleküle durch Rotation anzugeleichen. In der Phase steckt mehr Information als in der Amplitude und dominiert somit die Fouriertransformation. In den nachfolgenden Verfeinerungsschritten wird das wieder ausgeglichen.

Hier wird eine ΔnfB -Variante des MoFe-Proteins der Nitrogenase aus *Azotobacter vinelandii* verwendet, welche kein Eisenschwefelcluster besitzt. Von dieser Struktur haben wir die Röntgendiffraktionsdaten und wollen mit Hilfe des gleichen Proteins mit Eisenschwefelcluster die Struktur der ΔnfB -Variante mittels Molekularen Ersatz lösen und anschließend weiter verfeinern.

Teilversuch 1: Molekularer Ersatz

Als Ausgangsdaten werden hier die reduzierten und skalierten Daten der Röntgenndiffraktion des ΔnfB -Variante Nitrogenase MoFe-Proteins verwendet. Diese stehen in der Datei scale.hkl. Als Raumgruppe ist $P\ 2_1$ angegeben und ab Zeile vier sind Werte in fünf Spalten zu erkennen: Die h , k , l -Werte, die Intensität der Reflexe und der Fehlerwert. Die Anzahl der Reflexe beträgt 59936. Eine große Zahl an Reflexen lässt später eine höhere Auflösung zu. Unique reflections sind Reflexe, nur einmal vorkommen. Dieser Datensatz wird in ein binäres mtz-file umgewandelt um für andere Programme kompatibel zu sein. Die Werte der mtz-File werden sortiert (sorting run) und im Ursprung zentriert und daraus Strukturfaktoren berechnet

(tabling run). Als Suchmodell wird ein pdb-File das MoFe-Protein mit Cofaktor verwendet. Dabei werden in der Datei tabling.log wichtige Daten gespeichert:

Minimal box:	6,51	80,56	67,20
Minimal sphere:	51,27		
Center of Mass:	2,92	-14,22	-0,33

Anschließend werden die Modelle so gedreht, dass sie möglichst gut übereinstimmen (rotting run). Für die Durchführung müssen drei Parameter eingegeben werden, der Patterson-Integrationsradius, die Größe der Box und der verwendete Auflösungsbereich. Der Integrationsradius ist derjenigen Radius, bis wohin die Schwärzungen auf dem Röntgenfilm für die Berechnung verwendet werden, wir nehmen hier 0 als unteren und Werte von 10.5 bis 30 als oberen Grenzwert. Die Boxgröße beschreibt die Ausmaße des artifiziellen Kristalls, welchen wir willkürlich Kantenlängen von 50 bis 400 geben. Als Auflösungsbereich verwenden wir Intervalle zwischen 10 und 4. Als Lösung erhält man mehrere mögliche Rotationslösungen, welche die Modelle unterschiedlich gut zur Deckung bringen, weil die beiden nicht exakt zur Deckung gebracht werden können und so mehrere Möglichkeiten denkbar wären. Diese werden in der Dateien rotation.log mit den α -, β -, γ -Winkeln angegeben, der CC_F-Wert sagt etwas über die Richtigkeit der ersten Lösung aus. Wenn die Werte danach signifikant abfallen grenzt das die richtige von anderen möglichen Lösungen ab, diese Differenz fällt je nach gewählten Werten unterschiedlich aus, so dass man diese Werte optimieren kann.

Wählt man die obere Grenze der Integrationsradius zu groß (30) erhält man keine richtige Lösung. Ist der Wert zu klein (10.5) hat man keinen signifikanten Abfall des CC_F-Wertes, aber noch die richtige Lösung. Das Intervall 0 – 15 eignet sich hier am besten, 10 als Obergrenze führt zum Programmabbruch (siehe Anhang).

Große Werte für die Boxgröße haben zur Folge, dass die störenden Fremdvektoren viel größer als die gewünschten Selbstvektoren werden und so besser zwischen den beiden Vektorarten unterschieden werden kann. Werte um 200 gaben hohe Differenzen im CC_F-Wert, während 50 nicht die richtige Rotationslösung liefert. Der Wert 400 ist zu groß und führt zum Programmabbruch (siehe Anhang).

Wählt man beim Auflösungsbereich die untere Grenze kleiner als 4 (hier 3) bekommt man ein brauchbares Ergebnis während 6 kein geeigneter Wert mehr ist. Wählt man die obere Grenze kleiner (hier 8) ist erhält man immer noch die richtige Lösung und einen sehr hohen relativen Abfall des CC_F-Wertes (siehe Anhang).

Generell liefert das Programm mit den gleichen Parametern unterschiedliche Werte für die Winkel und auch für den den Abfall des CC_F-Wertes (siehe Anhang).

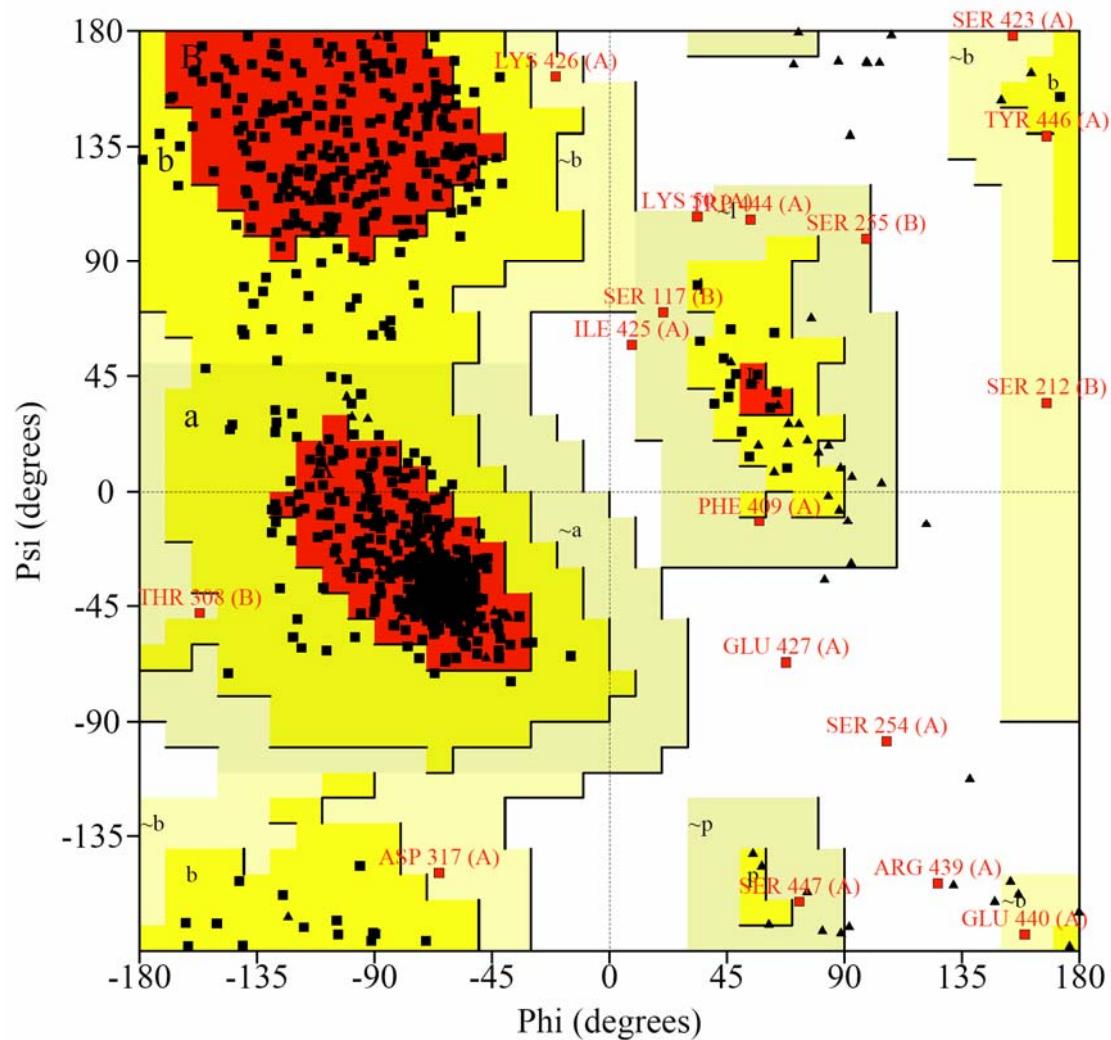
Für die drei besten Rotationslösungen werden nun Translationslösungen gesucht. An Hand der gefundenen Translationslösungen lässt sich auch wieder verifizieren, welche Rotationslösung die richtige ist. Als letzter Schritt vor der Verfeinerung wird das rigid body-Refinement durchgeführt. Hier wird das ganze Protein als starrer Körper betrachtet und man erhält optimierte Werte für die Rotationswinkel und Translationskoordinaten, bevor diese auf das Suchmodell angewendet werden. Anschließend werden die Elektronendichtekarten 2Fo-Fc und Fo-Fc durch das Programm CNS_SOLVE berechnet. Die Elektronendichtekarten und die Lösung des Molekularen Ersatzes werden dann für die Verfeinerung weiterverwendet.

Teilversuch 2: Verfeinerung

Die Verfeinerung dient dazu, dass eigene Modell möglichst gut an die gemessenen und daraus berechneten Daten anzupassen und zwar so, dass eine sinnvolle Geometrie entsteht. Für die Verfeinerung wird die vorhandene Struktur abwechselnd manuell und automatisch so optimiert, dass es mit der Elektronendichtekarte möglichst gut übereinstimmt. Es werden zwei Dichtekarten verwendet: 2Fo-Fc zeigt den Bereich in dem sich die Atome des Modells befinden sollten und Fo-Fc zeigt in rot negative Elektronendichte, dort sind im eigenen Modell Atome falsch platziert, und in grün positive Elektronendichte, dort fehlen im eigenen Modell Atome. Einfach ausgedrückt heißt das, dass man durch Manipulation Atome vom roten in grünen Bereich bringen muss. Dazu stehen in Coot im Menü "Modell/Fit/Refine" vor allem die Befehle "Regularize Zoine", "Rigid Body Fit Zone" und "Rotate/Translate Zone" zur Verfügung. In unserem anzupassenden Model sind bereits alle Aminosäuren bis auf einen Bereich von 20 Aminosäuren optimiert deren Reste zusätzlich durch Alanine ersetzt sind (a427 bis a447). Das nun manuell verfeinerte Modell wird wieder einem automatischen Verfeinerungsschritt unterzogen und dieses dann wieder in Coot weiteroptimiert. Wenn die Hauptkette einigermaßen passt werden die Alanine durch die tatsächlichen Reste ausgetauscht und die Reste weiter an die Elektronendichtekarte angepasst. Befindet man das verfeinerte Modell als gut werden durch das Hinzufügen von Wassermolekülen bisher nicht gefüllte Bereiche ausgefüllt. Nach unserer Optimierung zeigt ein Vergleich mit der veröffentlichten Struktur des Proteins erstaunliche Übereinstimmung. Größere Abweichungen in der Hauptkette traten nur bei zwei Resten auf. Abweichungen in der Seitenkette ist bei etwa drei Aminosäuren, was daher röhrt, dass entweder auf Grund der Beweglichkeit des Restes die Seitenkette keine definierte Elektronendichte an einem konkreten Ort ausweist oder dass wir für die Ausrichtung der Seitenkette andere Bereiche mit positiver Elektronendichte belegt haben. Bei diesen Optimierungen soll der kristallographische sowie der freie R-Faktor stetig sinken. Da die Verfeinerung darauf abzielt den R-Faktor zu minimieren sinkt dieser im Verlauf der Prozedur automatisch ohne dass das Modell zwangsläufig besser werden muss. Dies ist vor allem dadurch möglich, dass die experimentell erhaltenen Daten nur für ein unterbestimmtes Problem reichen. Deswegen werden zu Beginn 10% der Reflexe für die Berechnung der R-Faktors ausgenommen und daraus der unabhängige freie R-Faktor R(free) errechnet, welcher im Verlauf ebenfalls sinken soll aber immer über dem R-Faktor liegt. R(free) einer fertig verfeinerten Struktur sollte in einem Bereich zwischen 15% und 30% liegen und der R-Faktor unter 20%. Der Temperaturfaktor sagt etwas über die Beweglichkeit eines Atoms aus. Je nach Auflösung kann man den mittleren B-Faktor bei 3.5 bis 2.8 Å, den individuellen B-Faktor bei 2.8 bis 1.5 Å und den anisotropen B-Faktor unter 1.5 Å angeben. Der individuelle Temperaturfaktor bezieht sich auf die jeweilige Beweglichkeit eines einzelnen Atoms während bei dem anisotropen B-Faktor für jedes Atom die unterschiedliche Beweglichkeit entlang der Achsen angegeben werden kann. Constraints und Restraints werden hier verwendet weil es sich um ein unterbestimmtes Problem handelt, sprich relativ wenige Observablen als nötig vorhanden sind. Durch Constraints wird die Verfeinerung durch Einführung starrer Geometrie vorangetrieben während mit Restraints durch Einführung von geometrischen Zielwerten etwas mehr Freiheitsgrade geschaffen werden.

Teilversuch 3: Validierung

Durch das Programm Procheck kann die erhaltene Struktur auf viele Statistische Parameter und Abweichungen von Winkeln und Bindungslängen untersucht werden. Mittels Ramachandranplot, auch für jeder Aminosäureart wird überprüft, ob im gefundenen Modell Ausreißer zu erkennen sind, deren an Anzahl unter 1% liegen sollte.



In der Umgebung der von uns optimierten Aminosäuren sind vier (gesamtes Protein: 13, entspricht 1.5%) in generell erlaubten Bereich (426, 446, 444, 447) und drei (gesamtes Protein: 4, entspricht 0.6%) in nicht erlaubten Bereich (425, 427, 439). Vor allem letztere deuten darauf hin, dass noch dort Optimierungsbedarf herrscht.

Ein Modell des P-Clusters wird zusätzlich in das Proteinmodell geladen und untersucht wie der Cluster dort komplexiert ist:

Aminosäure	Untereinheit	Komplexiertes Atom
Cys 70	β	Fe7
Cys 95	β	Fe8
Cys 154	α 1	Fe2
Cys 88	α 1	Fe4
Cys 95	β	Fe1
Cys 62	α 1	Fe3
Cys 88	α 1	Fe5
Cys 153	β	Fe6

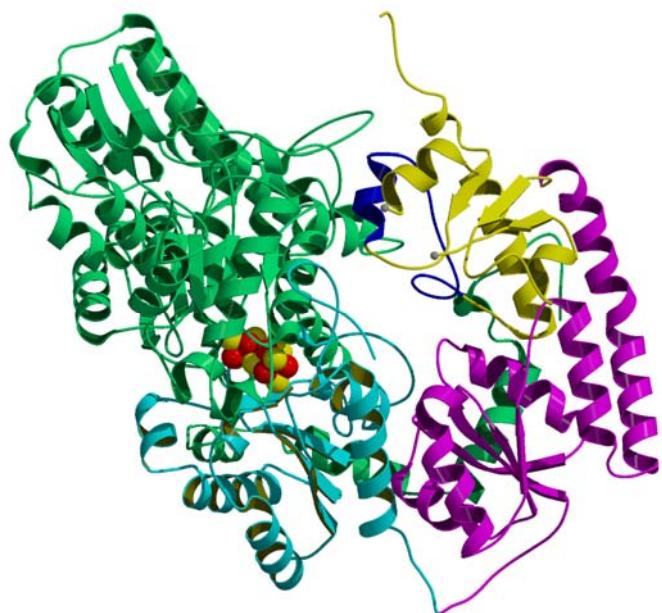
Das P-Cluster befindet sich zwischen der β - und α 1-Untereinheit. Die Cysteine 88 und 95 komplexieren jeweils zwei Eisenatome.

Mit Hilfe der Programms „O“ kann die Änderung der Konformation der Peptidkette mit und ohne FeMoCo in einer Animation veranschaulicht werden. Die dabei vollzogene Bewegung muss aber nichts mit dem in vitro-Mechanismus zu tun haben, mit dem das Cluster integriert. In dem Protein mit Cofaktor ist dieser komplett vom Protein umschlossen, bei der cofaktorfreien Variante ist aber eine Öffnung zu der Tasche zu erkennen. Vor allem vier Bereiche sind in den beiden Strukturen unterschiedlich:

- Aminosäuren 254 – 363 klappen wie eine Schnalle beiseite
- Aminosäuren 423 – 426 drehen sich auf
- Aminosäuren 440 – 445 drehen sich etwas auf
- Aminosäuren 377 – 380 bewegen sich leicht zu Seite

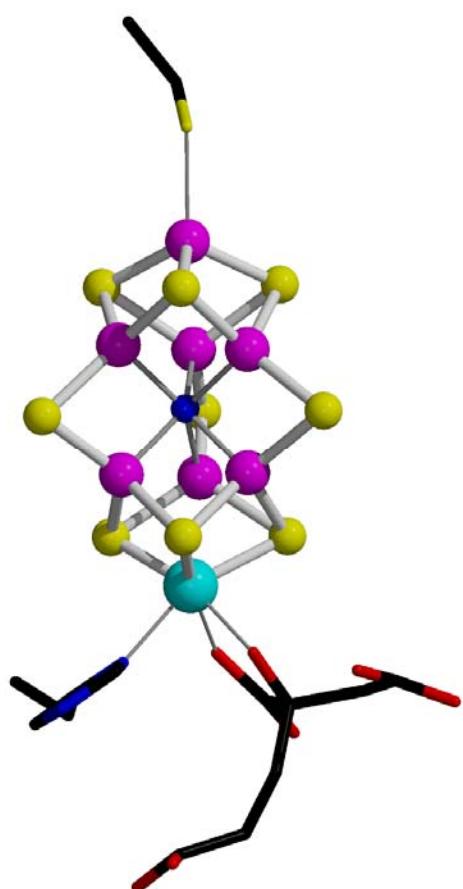
Die Farbgebung geschieht in Abhängigkeit des B-Faktors, höhere Werte erzeugen eine rote Färbung

Zuletzt betrachten wir die Bilder bild1.in und bild2.in und änderten die RGB-Farbwerke.



MoFe-Protein :

grün: β -Untereinheit
türkis: $\alpha 1$ -Untereinheit
violett: $\alpha 2$ -Untereinheit
gelb: $\alpha 3$ -Untereinheit
rot-gelbes Karlottenmodell:
P-Cluster
In der „Lücke“ zwischen den
 α -Untereinheiten befindet sich
normal der Eisenschwefelcofaktor.



FeMoCo:

Das Molybdän wird von drei Schwefelatomen (S1B, S3B, S4B), zwei Sauerstoffen des Homocitrats (O5 und O7, unten rechts) und dem δ -Stickstoff des Histidins 442 (unten links) oktaedrisch komplexiert. Oben ist das Eisen 1 durch das Cystein 275 der $\alpha 2$ -Untereinheit komplexiert.

schwarz: Kohlenstoff
rot: Sauerstoff
blau: Stickstoff
gelb: Schwefel
violett: Eisen
türkis: Molybdän

Patterson-Integrationsradius: 0 - 15

Boxgröße: 96.15 80.56 67.20

Auflösungsbereich: 10 - 4

	ITAB	ALPHA	BETA	GAMMA	TX	TY	TZ	CC_F	RF_F	CC_I	CC_P	Icp
SOLUTIONRC	1	165.63	57.28	324.42	0.0000	0.0000	0.0000	10.9	54.0	21.8	20.0	1
SOLUTIONRC	1	59.98	59.08	138.75	0.0000	0.0000	0.0000	6.6	55.2	13.8	17.5	2
SOLUTIONRC	1	150.87	86.60	297.45	0.0000	0.0000	0.0000	5.8	55.5	13.5	21.6	3

Richtige Lösung, signifikanter Abfall

Patterson-Integrationsradius: 0 - 15

Boxgröße: 200.0 200.0 200.0

Auflösungsbereich: 10 - 4

	ITAB	ALPHA	BETA	GAMMA	TX	TY	TZ	CC_F	RF_F	CC_I	CC_P	Icp
SOLUTIONRC	1	165.86	57.20	323.96	0.0000	0.0000	0.0000	11.5	53.9	22.7	20.6	1
SOLUTIONRC	1	60.18	59.33	138.35	0.0000	0.0000	0.0000	6.6	55.2	13.7	17.6	2
SOLUTIONRC	1	51.00	15.01	306.50	0.0000	0.0000	0.0000	6.1	55.3	13.4	16.4	3

Richtige Lösung, signifikanter Abfall (zweitbeste)

Patterson-Integrationsradius: 0 - 15

Boxgröße: 50.0 50.0 50.0

Auflösungsbereich: 10 - 4

	ITAB	ALPHA	BETA	GAMMA	TX	TY	TZ	CC_F	RF_F	CC_I	CC_P	Icp
SOLUTIONRC	1	20.79	35.83	358.22	0.0000	0.0000	0.0000	6.0	55.6	13.2	21.8	1
SOLUTIONRC	1	86.07	85.28	257.61	0.0000	0.0000	0.0000	5.8	55.4	12.4	17.1	2
SOLUTIONRC	1	62.95	53.05	145.01	0.0000	0.0000	0.0000	5.6	55.5	12.0	19.4	3

Keine richtige Lösung

Patterson-Integrationsradius: 0 - 15

Boxgröße: 400.0 400.0 400.0

Auflösungsbereich: 10 - 4

```
flg8/molrep> csh rotation.csh
AMORE: Reset ROTING_MI and ROTING_MC
rm: cannot remove `temp1.clmn': No such file or directory
rm: cannot remove `temp0.clmn': No such file or directory
rm: cannot remove `temp.map': No such file or directory
```

Programmabbruch (Boxgröße zu groß)

Patterson-Integrationsradius: 0 - 15

Boxgröße: 200.0 200.0 200.0

Auflösungsbereich: 10 - 3

	ITAB	ALPHA	BETA	GAMMA	TX	TY	TZ	CC_F	RF_F	CC_I	CC_P	Icp
SOLUTIONRC	1	167.23	56.28	322.08	0.0000	0.0000	0.0000	28.8	54.3	42.6	24.6	1
SOLUTIONRC	1	124.30	52.15	32.15	0.0000	0.0000	0.0000	22.5	56.3	32.0	14.1	2
SOLUTIONRC	1	107.76	44.15	31.35	0.0000	0.0000	0.0000	22.2	56.4	32.0	14.3	3

Richtige Lösung, signifikanter Abfall

Patterson-Integrationsradius: 0 - 15

Boxgröße: 200.0 200.0 200.0

Auflösungsbereich: 10 - 6

	ITAB	ALPHA	BETA	GAMMA	TX	TY	TZ	CC_F	RF_F	CC_I	CC_P	Icp
SOLUTIONRC	1	46.86	90.00	167.55	0.0000	0.0000	0.0000	13.7	53.9	23.0	33.2	1
SOLUTIONRC	1	10.10	42.63	1.83	0.0000	0.0000	0.0000	13.4	53.8	23.0	43.0	2
SOLUTIONRC	1	173.20	39.43	324.33	0.0000	0.0000	0.0000	12.8	54.1	24.3	24.0	3

Keine richtige Lösung

Patterson-Integrationsradius: 0 - 30
Boxgröße: 140.0 140.0 140.0
Auflösungsbereich: 10 - 4

	ITAB	ALPHA	BETA	GAMMA	TX	TY	TZ	CC_F	RF_F	CC_I	CC_P	Icp
SOLUTIONRC	1	1.21	67.78	132.85	0.0000	0.0000	0.0000	14.9	53.3	27.7	11.2	1
SOLUTIONRC	1	10.48	81.31	1.23	0.0000	0.0000	0.0000	14.7	53.3	24.1	11.8	2
SOLUTIONRC	1	28.27	82.05	306.62	0.0000	0.0000	0.0000	14.0	53.6	25.1	12.8	3

Keine richtige Lösung

Patterson-Integrationsradius: 0 - 30
Boxgröße: 200.0 200.0 200.0
Auflösungsbereich: 10 - 4

	ITAB	ALPHA	BETA	GAMMA	TX	TY	TZ	CC_F	RF_F	CC_I	CC_P	Icp
SOLUTIONRC	1	1.28	67.55	133.14	0.0000	0.0000	0.0000	15.2	53.3	27.9	11.2	1
SOLUTIONRC	1	10.31	81.42	1.30	0.0000	0.0000	0.0000	14.7	53.3	24.1	12.3	2
SOLUTIONRC	1	28.24	82.26	306.46	0.0000	0.0000	0.0000	14.1	53.6	25.2	12.7	3

Keine richtige Lösung

Patterson-Integrationsradius: 0 - 20
Boxgröße: 200.0 200.0 200.0
Auflösungsbereich: 10 - 4

	ITAB	ALPHA	BETA	GAMMA	TX	TY	TZ	CC_F	RF_F	CC_I	CC_P	Icp
SOLUTIONRC	1	164.45	47.42	168.59	0.0000	0.0000	0.0000	13.2	53.8	23.3	23.8	1
SOLUTIONRC	1	104.01	65.59	212.67	0.0000	0.0000	0.0000	13.0	53.8	22.1	25.8	2
SOLUTIONRC	1	10.86	79.59	357.36	0.0000	0.0000	0.0000	12.6	54.1	22.9	21.8	3

Keine richtige Lösung

Patterson-Integrationsradius: 0 - 10
Boxgröße: 200.0 200.0 200.0
Auflösungsbereich: 10 - 6

flg8/molrep> csh rotation.csh
AMORE: > s/r dimrs < impossible l-limits

Programmabbruch (obere Grenze des Integrationsradius zu klein)

Patterson-Integrationsradius: 5 - 15
Boxgröße: 200.0 200.0 200.0
Auflösungsbereich: 10 - 6

	ITAB	ALPHA	BETA	GAMMA	TX	TY	TZ	CC_F	RF_F	CC_I	CC_P	Icp
SOLUTIONRC	1	359.47	34.79	325.63	0.0000	0.0000	0.0000	12.9	54.3	25.2	38.7	1
SOLUTIONRC	1	44.51	88.12	170.59	0.0000	0.0000	0.0000	12.5	54.1	22.1	38.2	2
SOLUTIONRC	1	139.21	90.00	29.50	0.0000	0.0000	0.0000	12.2	54.3	21.0	46.5	3

Keine richtige Lösung

Patterson-Integrationsradius: 0 - 15
Boxgröße: 140.0 140.0 140.0
Auflösungsbereich: 8 - 4

	ITAB	ALPHA	BETA	GAMMA	TX	TY	TZ	CC_F	RF_F	CC_I	CC_P	Icp
SOLUTIONRC	1	165.40	56.93	324.75	0.0000	0.0000	0.0000	8.1	54.2	16.0	24.4	1
SOLUTIONRC	1	60.19	58.14	138.50	0.0000	0.0000	0.0000	3.2	55.3	5.9	17.6	2
SOLUTIONRC	1	53.30	15.36	303.91	0.0000	0.0000	0.0000	3.0	55.4	6.1	15.8	3

Richtige Lösung, signifikanter Abfall (bester)

Patterson-Integrationsradius: 0 - 11

Boxgröße: 140.0 140.0 140.0

Auflösungsbereich: 10 - 4

	ITAB	ALPHA	BETA	GAMMA	TX	TY	TZ	CC_F	RF_F	CC_I	CC_P	Icp
SOLUTIONRC	1	166.91	55.59	316.50	0.0000	0.0000	0.0000	6.6	55.3	14.0	38.3	1
SOLUTIONRC	1	122.59	55.84	193.61	0.0000	0.0000	0.0000	5.9	55.4	12.1	28.6	2
SOLUTIONRC	1	359.17	43.10	353.00	0.0000	0.0000	0.0000	5.8	55.5	12.2	30.9	3

Richtige Lösung, kaum signifikanter Abfall

Patterson-Integrationsradius: 0 - 12

Boxgröße: 140.0 140.0 140.0

Auflösungsbereich: 10 - 4

	ITAB	ALPHA	BETA	GAMMA	TX	TY	TZ	CC_F	RF_F	CC_I	CC_P	Icp
SOLUTIONRC	1	164.46	59.20	322.45	0.0000	0.0000	0.0000	7.9	54.8	16.1	29.6	1
SOLUTIONRC	1	359.87	43.38	353.14	0.0000	0.0000	0.0000	5.8	55.5	12.2	29.4	2
SOLUTIONRC	1	103.94	31.61	80.54	0.0000	0.0000	0.0000	5.6	55.6	11.5	23.7	3

Richtige Lösung, kaum signifikanter Abfall

Patterson-Integrationsradius: 0 - 10.5

Boxgröße: 140.0 140.0 140.0

Auflösungsbereich: 10 - 4

	ITAB	ALPHA	BETA	GAMMA	TX	TY	TZ	CC_F	RF_F	CC_I	CC_P	Icp
SOLUTIONRC	1	168.67	52.85	316.50	0.0000	0.0000	0.0000	7.3	55.1	15.1	36.9	1
SOLUTIONRC	1	98.32	34.05	86.38	0.0000	0.0000	0.0000	5.9	55.4	12.7	28.7	2
SOLUTIONRC	1	47.83	78.97	157.61	0.0000	0.0000	0.0000	5.9	55.4	12.2	25.9	3
SOLUTIONRC	1	168.13	54.30	314.67	0.0000	0.0000	0.0000	6.2	55.3	13.4	46.4	1
SOLUTIONRC	1	122.36	54.81	194.32	0.0000	0.0000	0.0000	5.8	55.3	12.2	33.2	2
SOLUTIONRC	1	149.02	70.32	58.01	0.0000	0.0000	0.0000	5.3	55.5	11.0	37.5	3
SOLUTIONRC	1	168.67	52.85	316.50	0.0000	0.0000	0.0000	7.3	55.1	15.1	36.9	1
SOLUTIONRC	1	98.32	34.05	86.38	0.0000	0.0000	0.0000	5.9	55.4	12.7	28.7	2
SOLUTIONRC	1	47.83	78.97	157.61	0.0000	0.0000	0.0000	5.9	55.4	12.2	25.9	3
SOLUTIONRC	1	168.13	54.30	314.67	0.0000	0.0000	0.0000	6.2	55.3	13.4	46.4	1
SOLUTIONRC	1	122.36	54.81	194.32	0.0000	0.0000	0.0000	5.8	55.3	12.2	33.2	2
SOLUTIONRC	1	149.02	70.32	58.01	0.0000	0.0000	0.0000	5.3	55.5	11.0	37.5	3

Richtige Lösung, kaum signifikanter Abfall, unterschiedliche Lösungen zu den gleichen Parametern nach mehrmaligem Programmlauf