



Ein graphtheoretischer Ansatz für das *multiple sequence Alignment*-Problem

Bachelorarbeit

vorgelegt von:

Joschka Hannes Strüber

Matrikelnummer: 418702

Studiengang: B.Sc. Informatik

Arbeit betreut durch:

Prof. Dr. Jan Vahrenhold

Prof. Dr. Xiaoyi Jiang

Münster, 22. Mai 2018

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Motivation	1
1.1. Ablauf der Bachelorarbeit	2
2. Dynamische Programmierung und der Algorithmus von Needleman und Wunsch	3
2.1. Dynamische Programmierung	3
2.2. Der Algorithmus	4
2.3. Komplexität	8
3. Das DIALIGN-Verfahren	11
3.1. Theoretische Grundlagen	12
3.2. Gewichtsfunktionen und Substitutionsmatrizen	14
3.2.1. Gewichtsfunktionen in DIALIGN 1	14
3.2.2. Substitutionsmatrizen	14
3.2.3. Gewichtsfunktionen in DIALIGN 2	16
3.3. Paarweise Alignments mit dynamischer Programmierung	17
3.3.1. Speichereffiziente Berechnung der paarweisen Alignments	19
3.3.2. Laufzeit	22
3.3.3. Beispiel zur Berechnung paarweiser Alignments	23
3.4. Überlappgewichte	25
3.4.1. Verbesserte Berechnung und Laufzeit	25
3.4.2. Beispiel Überlappgewichte	27
3.5. Konsistenz	28
3.5.1. Berechnung der transitiven Hülle eines gerichteten Graphen	30
3.5.2. Konsistenzgrenzen durch Berechnung der transitiven Hülle	33
3.5.3. Zusätzliche Einsparungen an Speicherplatz	36
3.5.4. Einbindung in DIALIGN	37
3.5.5. Evaluation von DIALIGN mit der GABIOS-LIB	37
3.5.6. Beispiel zu Konsistenzgrenzen	37
3.6. Abschluss des Verfahrens	41
3.6.1. Gesamtkomplexität	42
3.7. Evaluierung, Zusammenfassung und Schwächen des Ansatzes	43
3.7.1. Evaluierung	43
3.7.2. Zusammenfassung	43
3.7.3. Schwächen von DIALIGN	44
4. Ein Min-Cut-Ansatz für das Konsistenzproblem	47
4.1. Flussnetzwerke	47
4.1.1. Einführung	47
4.1.2. Wichtige Algorithmen	49
4.1.3. Schnitte und der <i>Max-Flow-Min-Cut-Satz</i>	50

Inhaltsverzeichnis

4.2. Inzidenzgraphen und das Auflösen von Inkonsistenzen mit Hilfe von Flussnetzwerken	52
4.2.1. Konstruieren des Inzidenzgraphen	52
4.2.2. Beispiel Inzidenzgraph	53
4.2.3. Auflösen von Mehrdeutigkeiten	54
4.2.4. Beispiel von ResolveAmbiguities	56
4.2.5. Komplexität	57
4.3. Sukzessionsgraphen und der Algorithmus von Pitschi	58
4.3.1. Aufbau des Sukzessionsgraphen	58
4.3.2. Der Algorithmus von Pitschi	60
4.3.3. Algorithmus zur Bestimmung eines längsten Pfads	63
4.3.4. Verankerungen	65
4.3.5. Komplexität des Algorithmus von Pitschi	65
4.4. Abschluss und Zusammenfassung	66
4.4.1. Beispiel	67
4.4.2. Gesamtkomplexität des Min-Cut-Ansatzes	67
4.4.3. Probleme bei der Heuristik zum Entfernen von Kanten	68
4.4.4. Evaluierung	69
4.4.5. Zusammenfassung des Min-Cut-Ansatzes	70
5. Programmierung	71
5.0.1. Beispiel zu longestPath	74
6. Fazit	77
6.1. Zusammenfassung	77
6.2. Weiterführen Arbeiten	78
A. BLOSUM62	85
B. Beispiel der speichereffizienten Berechnung eines paarweisen Alignments	87

1. Einleitung und Motivation

Das Berechnen von multiplen Sequenzalignments ist eine fundamentale Technik mit einer Vielzahl von Anwendungsgebieten in der Biologie, aber auch in anderen Disziplinen wie dem *Natural Language Processing*. Ziel von Sequenzalignments ist es, für eine Menge von Zeichenketten aus einem endlichen Alphabet Zuordnungen zwischen den einzelnen Symbolen zu finden, sodass möglichst ähnlich Symbole oder ganze Abschnitte einander zugeordnet sind. Man versucht auf diese Weise funktionelle, strukturelle oder evolutionäre Ähnlichkeiten aufzuspüren. Ein Beispiel für relevante strukturelle Ähnlichkeiten sind Proteinsequenzen. Wenn Proteine aus ähnlichen Aminosäuren in vergleichbaren Reihenfolgen aufgebaut sind, dann kann man davon ausgehen, dass diese auch eine ähnliche 3D-Struktur und ähnliche Funktionen haben, selbst wenn sie in unterschiedlichen Organismen vorkommen. Im Laufe der Evolution verändern sich aufgrund von Mutationen DNA und Proteine von Arten. Diese Vorgänge sind die Ursache für den beispiellosen Reichtum an Lebewesen auf der Erde. Mit Hilfe von Sequenzalignments kann man nachvollziehen, wie diese Entwicklung vonstatten gegangen ist. Zu den häufigsten Mutationsarten bei Genmutationen (im Gegensatz zu Genommutationen und Chromosomenmutationen) gehören Punktmutationen, bei denen eine einzelne DNA-Base durch eine andere ersetzt wird, sowie Deletionen und Insertionen, bei denen ganze Abschnitte einer Sequenz gelöscht oder eingefügt wurden. Glücklicherweise besitzen unsere Alignments Möglichkeiten, genau diese Situationen abzubilden. Informell könnte man sagen, dass man bei einer Zuweisung die Elemente der Eingabestrings einander so zuordnet, dass jedem Symbol genau ein Symbol jeder anderen Sequenz oder eine neu eingefügte Lücke, *Gap* genannt, zugeordnet ist. Dabei darf die Reihenfolge der Elemente nicht verändert werden.

Betrachten wir dazu zwei kleine Beispiele von Wörtern, die häufig falsch geschrieben werden:

OR-GINAL	SYLVESTER
ORIGINAL	SILVESTER

Im ersten Fall wurde bei der falschen Schreibweise ein benötigter Buchstabe weggelassen. Damit es trotzdem zu einer passenden Zuordnung der anderen Buchstaben kommt, wurde in die erste Sequenz eine Lücke (-) eingefügt. Im evolutionären Kontext wäre dies ein Beispiel für eine Deletion. Beim zweiten Wortpaar wurde ein Buchstabe durch einen anderen, fehlerhaften ersetzt. Das ist ein klassisches Beispiel für eine Punktmutation oder einen Einzelnukleotid-Polymorphismus. Die Berechnung eines Sequenzalignments ist in vielen Fällen der erste Schritt einer Sequenzanalyse in der Molekularbiologie [CPM10]. Diese Analysen dienen unter anderem der Bestimmung, ob Sequenzen miteinander verwandt sind (Homologie), von Markergenen oder der direkten Schlussfolgerung von Sequenzen auf ihre molekulare Struktur.

Ein zweites großes Einsatzgebiet des *Multiple-Sequence-Alignment-Problems* ist das *Natural Language Processing*, also die maschinelle Verarbeitung menschlicher Sprache [Szy10]. Sätze, Wörter oder Ausdrücke können aligniert werden, um mechanisch Sätze zu

1. Einleitung und Motivation

übersetzen oder Texte zusammenzufassen. Noch einen Schritt weiter geht das Alignieren von *Phonemen*, unter anderem von der textuellen Darstellung auf die Aussprache geschlossen oder umgekehrt Sprache textuell darzustellen. Obwohl viele dieser Anwendungen nur auf zwei Sequenzen arbeiten, wie beispielsweise einem Text und seiner Übersetzung, gibt es auch Fälle bei denen multiple Alignments nötig sind. Dazu gehören unter anderem Vergleiche von Texten, die in anderen Worten denselben Inhalt wiedergeben, oder von gleichbedeutenden Worten aus unterschiedlichen Sprachen der selben Sprachfamilie. In der Sprachentwicklung gibt es interessante Parallelen zu den evolutionären Vorgängen in Genomen. Im Kontext dieser Bachelorarbeit werden wir uns jedoch auf Anwendungen in der molekularen Bioinformatik beschränken.

1.1. Ablauf der Bachelorarbeit

Im zweiten Kapitel führen wir mit dem Algorithmus von Needleman-Wunsch einen Standardansatz für paarweise Alignments ein. Am Beispiel dieses Algorithmus beschäftigen wir uns mit der Komplexität des *Multiple-Sequence-Alignment*-Problems und stellen fest, dass es für Zuweisungen zwischen mehr als nur einigen wenigen Sequenzen nicht zielführend ist, diese mathematisch exakt zu berechnen. Um diesem Problem Herr zu werden, lernen wir im Laufe der Bachelorarbeit zwei ausgefeilte Heuristiken für multiple Sequenzalignments ein. Zunächst lernen wir mit DIALIGN einen Algorithmus kennen, der im Gegensatz zu Needleman-Wunsch nicht auf der Basis von einzelnen Symbolen Alignments konstruiert [MDW96]. Stattdessen werden ganze Segmente als Bausteine der Zuweisungen benutzt. Der zweite Algorithmus ist der graphtheoretische Ansatz von Corel et al. [CPM10]. Dieser basiert zwar auch auf DIALIGN, hat aber den Anspruch in Situationen, bei denen die Heuristik von DIALIGN falsche Entscheidungen trifft, bessere Ergebnisse zu liefern. Exemplarisch wird danach ein wichtiger Schritt des Verfahrens als Computerprogramm umgesetzt. Dabei wird mit der Programmiersprache C++ und der *Boost Graph Library* gearbeitet.

2. Dynamische Programmierung und der Algorithmus von Needleman und Wunsch

Einer der ersten Algorithmen zur Berechnung von paarweisen Alignments war der von [NW70]. Dieser weist Zuweisungen auf Symbolebene zwischen zwei Sequenzen Werte zu und das Ziel ist es mit Hilfe von dynamischer Programmierung die Summe dieser Werte zu maximieren. Wir werden in den nächsten Abschnitten zunächst das Paradigma der dynamischen Programmierung kennenlernen, bevor wir es beim Algorithmus von Needleman-Wunsch benutzen. Unter Verwendung des Algorithmus lässt sich danach die Komplexität des *Multiple-Sequence-Alignment*-Problems verdeutlichen, die uns den Anlass gibt in den nächsten Kapiteln zwei leistungsstarke Heuristiken zu betrachten.

2.1. Dynamische Programmierung

Die dynamische Programmierung ist eine Technik zum algorithmischen Lösen von Optimierungsproblemen. Dazu wird ein größeres Problem unter Zuhilfenahme der Lösungen von sich überschneidenden Teilproblemen gelöst, wobei die zuvor berechneten Lösungen in einer Tabelle gespeichert werden. Durch die Wiederverwendung der bereits gelösten Teilprobleme lässt sich auf diese Weise die oft exponentielle Laufzeit eines naiven Algorithmus auf polynomielle Laufzeit verringern. Dabei muss man beachten, ob es für den jeweiligen Kontext angemessen ist den höheren Speicherbedarf aufgrund der zu speichernden Werte für die verbesserte Laufzeit in Kauf zu nehmen. Oft wird die dynamische Programmierung mit dem *Divide-and-Conquer*-Prinzip verwechselt. Beide Paradigmen darauf basieren ein Problem in kleinere Teilprobleme zu zerlegen. Der Hauptunterschied zwischen ihnen ist, dass das Problem bei Divide-and-Conquer in disjunkte statt in sich überlappende Teilprobleme zerlegt wird [CLRS09, S.359]. Denken wir beispielsweise an Mergesort zurück: ein Feld wird sortiert, indem immer größer werdende disjunkte Teilfelder miteinander verschmolzen werden.

In der Regel wird bei der dynamischen Programmierung zunächst eine Rekursionsgleichung aufgestellt, mit deren Hilfe sich das Problem beschreiben lässt. Im Gegensatz zur verwandten Technik der *Memoisation* wird diese Rekursionsgleichung jedoch nicht direkt und *top-down* umgesetzt. Stattdessen werden *bottom-up* zunächst die Basisfälle berechnet und darauf aufbauend immer größere Teilprobleme gelöst. Die Berechnung erfolgt dabei aber nichtsdestoweniger der Rekursionsformel entsprechend. Aufgrund der direkten Umsetzung der Rekursionsgleichung sind die Korrektheitsbeweise der Algorithmen der dynamischen Programmierung oft sehr einfach und aus der Korrektheit der Formel folgt meistens automatisch die des ganzen Algorithmus.

2.2. Der Algorithmus

Der Algorithmus von Needleman-Wunsch ist ein Alignierer auf der Basis von einzelnen Symbolen [NW70]. Da dieses Kapitel einen eher motivierenden Charakter hat, werden wir den Algorithmus auf einer etwas informelleren Ebene betrachten. Zunächst lernen wir dafür eine etwas einfachere Definition eines Alignments kennenlernen, die wir im nächsten Kapitel durch eine komplexere, aber äquivalente ergänzen, die sich insbesondere auch für multiple eignet, die aus mehr als zwei Sequenzen bestehen.

2.2.1 Definition (Alignment [NW70])

Seien $S_1[1, \dots, n]$ und $S_2[1, \dots, m]$ zwei Zeichenketten über einem endlichen Alphabet. Eine Relation \mathcal{R} zwischen Symbolen dieser beiden Sequenzen ist genau dann ein Alignment, wenn für alle Paare von Zweiertupeln $S_1[i], S_2[j]$ und $S_1[i'], S_2[j']$ aus \mathcal{R} gilt, dass aus $i < i'$ auch $j < j'$ folgt.

Mit anderen Worten: es gibt keine sich kreuzenden Zuweisungen.

Unser Ziel ist es jetzt aus allen möglichen Alignments von S_1 und S_2 das beste zu finden. Dazu brauchen wir eine Möglichkeit die Güte von Alignments zu vergleichen. Wenn zwei Symbole $s = S_1[i]$ und $s' = S_2[j]$ einander zugewiesen werden, dann weisen wir diesen ein Gewicht $\alpha_{s,s'}$ zu, abhängig von der Ähnlichkeit der beiden Symbole. Oft wird hier nur zwischen Übereinstimmungen und Abweichungen unterschieden, aber in manchen Kontexten, wie beispielsweise Proteinsequenzen, gibt es auch andere Möglichkeiten. Genauer widmen wir uns diesem Thema in Abschnitt 3.2.2. Wird hingegen eine Lücke in eine der beiden Sequenzen eingefügt, dann ziehen wir Kosten in der Höhe der Zahl δ ab. Dieser sogenannte *Gap Penalty* gibt ein Maß für die Abweichung von Sequenzen an, die durch Einfügen oder Löschen von Zeichen verändert wurden. Üblicherweise ist δ , genau wie die Gewichte α , eine benutzerdefinierte Eingabe. Welcher Gap Penalty die besten Ergebnisse liefert, hängt in der Regel von den zu alignierenden Sequenzen ab.

2.2.2 Definition (Score [NW70])

Gegeben seien zwei Sequenzen S_1 und S_2 und ein Alignment \mathcal{R} , sowie die Ähnlichkeitswerte α und der Gap Penalty δ . Dann definieren wir:

$$\text{score}(\mathcal{R}, S_1, S_2) := \sum_{(s,t) \in \mathcal{R}} \alpha_{s,t} - \sum_{s: \nexists t: (s,t) \in \mathcal{R}} \delta - \sum_{t: \nexists s: (s,t) \in \mathcal{R}} \delta$$

Der Score ist für ein Alignment beim Algorithmus von Needleman-Wunsch also als die Summe aller Ähnlichkeitswerte α von einander zugewiesenen Symbolen der beiden Sequenzen definiert, von denen die Gap Penalties aller eingefügten Lücken abgezogen werden. Das Ziel ist jetzt, eine Rekursionsgleichung aufzustellen mit deren Hilfe man den Score maximieren kann. Der maximale Score eines Alignments gibt uns ein Maß für die Ähnlichkeit zweier Sequenzen an: je höher er ist, desto mehr gleiche oder ähnliche Symbole wurden einander zugewiesen und desto weniger Lücken mussten wir in die Sequenzen einfügen.

Betrachten wir als kleines Beispiel zwei Alignments des Worts „Original“ in richtiger und fehlerhafter Schreibweise. Hierbei wählen wir $\alpha_{i,j} = 1$ für $i \neq j$ und $\alpha_{i,i} = 0$, sowie $\delta = 2$ als Gap Penalty.

<i>O</i>	<i>R</i>	<i>G</i>	<i>I</i>	<i>N</i>	<i>A</i>	<i>L</i>	–
<i>O</i>	<i>R</i>	<i>I</i>	<i>G</i>	<i>I</i>	<i>N</i>	<i>A</i>	<i>L</i>

Wie man sieht haben wir zwei Übereinstimmungen (O und R), fünf Abweichungen und eine eingefügte Lücke in die erste Sequenz. Der Score dieses Alignments beträgt also $(2 \cdot 1) - (1 \cdot 2) - (0 \cdot 2) = 0$. Nun zum zweiten:

<i>O</i>	<i>R</i>	–	<i>G</i>	<i>I</i>	<i>N</i>	<i>A</i>	<i>L</i>
<i>O</i>	<i>R</i>	<i>I</i>	<i>G</i>	<i>I</i>	<i>N</i>	<i>A</i>	<i>L</i>

Hier haben wir sieben Übereinstimmungen, keine Abweichung und wiederum eine Lücke. Der sich ergebende Score ist somit 5, was ein deutlich besseres Maß für die hohe Ähnlichkeit beider Sequenzen darstellt.

Die Art der Beschreibung und die Zwischenschritte sind im Folgenden an [KT05, S.281ff.] angelehnt, die den Algorithmus von Needleman-Wunsch modern aufbereitet haben. Anders als [NW70] berechnen sie jedoch nicht das maximale Gewicht eines Alignment, sondern stattdessen die maximalen Kosten, wobei die Zuweisung zwischen gleichen Symbolen geringe Kosten hat und Gap Penalties addiert statt subtrahiert werden [KT05, S.281, Lemma 6.16]. Das entspricht der Minimierung der sogenannten Editierdistanz von Levenshtein, einem äquivalenten Problem. Das Ergebnis ist letztendlich das gleiche, aber ich orientiere mich hierbei an der originalen Veröffentlichung von Needleman und Wunsch, weil wir später beim DIALIGN-Verfahren auch den (dort leicht anders definierten) Score maximieren wollen.

Zunächst starten wir mit der einfachen Feststellung, dass die letzten Elemente von S_1 und S_2 , $S_1[n]$ und $S_2[m]$, entweder miteinander aligniert sind oder nicht. Diese Aussage gilt aber auch für alle kürzeren Teilsequenzen der ursprünglichen Eingabe und das bietet uns einen Ansatz für die dynamische Programmierung.

2.2.3 Lemma ([KT05, S.281])

Sei \mathcal{R} ein Alignment von S_1 und S_2 . Falls $(n, m) \notin \mathcal{R}$ gilt, dann ist $S_1[n]$ oder $S_2[m]$ kein Element der jeweils anderen Sequenz zugeordnet.

Beweis. Angenommen es gilt $(n, m) \notin \mathcal{R}$ und es existieren Indizes $i < n$ und $j < m$, für die $(i, m) \in \mathcal{R}$ und $(n, j) \in \mathcal{R}$ gilt. Dann überkreuzen sich diese beiden Zuweisungen und das ist ein Widerspruch zur Definition eines Alignments. \square

Dieses Lemma können wir jetzt zu einem ersten Ansatz für die Rekursionsformel zur Berechnung des maximalen Scores umformulieren, denn bei einem optimalen Alignment tritt genau eine der folgenden drei Situationen ein:

1. $(n, m) \in \mathcal{R}$
2. $\nexists j \in \{1, \dots, m-1\}$ mit $(n, j) \in \mathcal{R} \rightarrow S_1[n]$ ist nicht zugewiesen
3. $\nexists i \in \{1, \dots, m-1\}$ mit $(i, m) \in \mathcal{R} \rightarrow S_2[m]$ ist nicht zugewiesen

Sei $\text{OPT}(i, j)$ der maximale Score der Teilsequenzen $S_1[1, \dots, i]$ und $S_2[1, \dots, j]$. OPT können wir in Anlehnung an die drei Fälle oben rekursiv berechnen. Entweder alignieren

2. Dynamische Programmierung und der Algorithmus von Needleman und Wunsch

wir die Elemente an den Stellen i und j miteinander oder $S_1[i]$ wird nicht zugeordnet oder $S_2[j]$ wird nicht zugeordnet. Im zweiten und dritten Fall muss dann in der jeweils anderen Sequenz eine Lücke eingefügt werden.

1. $\text{OPT}(i, j) = \text{OPT}(i - 1, j - 1) + \alpha_{S_1[i], S_2[j]}$
2. $\text{OPT}(i, j) = \text{OPT}(i - 1, j) - \delta$
3. $\text{OPT}(i, j) = \text{OPT}(i, j - 1) - \delta$

OPT lässt sich dann maximieren, indem das Maximum der drei möglichen Fälle bestimmt wird. Damit ergibt sich auch die Rekursionsgleichung, die zur Berechnung des optimalen Scores der ganzen Sequenzen mit dynamischer Programmierung dient. Für den Fall, dass eine Teilsequenz die Länge 0 hat, müssen wir so viele Lücken einfügen, wie die andere Teilsequenz lang ist. $(i, j) \in \mathcal{R}$ gilt genau dann, wenn bei $\text{OPT}(i, j)$ der erste Fall gewählt wurde.

2.2.4 Korollar

Es gelte $1 \leq i \leq n$ und $1 \leq j \leq m$. Dann folgt für den maximalen Score $\text{OPT}(i, j)$ der Teilsequenzen bis zu den Indizes i und j :

$$\text{OPT}(i, j) = \max\{\text{OPT}(i - 1, j - 1) + \alpha_{S_1[i], S_2[j]}, \text{OPT}(i - 1, j) - \delta, \text{OPT}(i, j - 1) - \delta\}$$

$$\text{OPT}(i, 0) = i \cdot \delta$$

$$\text{OPT}(0, j) = j \cdot \delta$$

Diese Rekursionsformel können wir direkt in einem Algorithmus münden lassen. Wie man sieht, ist der Algorithmus 1 anders als die Rekursionsgleichung nicht top-down, sondern bottom-up formuliert. Alle möglichen Einträge in der Matrix $O[1, \dots, n][1, \dots, m]$ werden unter Verwendung der zuvor berechneten Teilprobleme berechnet und gespeichert.

Algorithmus 1 Algorithmus für die Berechnung des maximalen Scores zweier Sequenzen S_1 und S_2 unter Verwendung von Ähnlichkeitswerten α und Gap Penalty δ

```
1: procedure OPTSEQUENCEALIGNMENT( $S_1, S_2, \alpha, \delta$ )
2:    $n \leftarrow |S_1|$ 
3:    $m \leftarrow |S_2|$ 
4:   Lege Array  $O[0, \dots, n][0, \dots, m]$  an.
5:   for  $i = 0$  to  $n$  do                                     ▶ Fülle  $S_2$  mit Lücken
6:      $O[i][0] \leftarrow -i \cdot \delta$ 
7:   end for
8:   for  $j = 0$  to  $m$  do                                     ▶ Fülle  $S_1$  mit Lücken
9:      $O[0][j] \leftarrow -j \cdot \delta$ 
10:  end for
11:  for  $i = 0$  to  $n$  do
12:    for  $j = 0$  to  $m$  do
13:       $O[i][j] \leftarrow \max\{O[i - 1, j - 1] + \alpha_{S_1[i], S_2[j]}, O[i - 1, j] - \delta, O[i, j - 1] - \delta\}$ 
14:    end for
15:  end for
16:  return  $O[n][m]$ 
17: end procedure
```

		O	R	I	G	I	N	A	L
	0	-2	-4	-6	-8	-10	-12	-14	-16
O	-2	1	-1	-3	-5	-7	-9	-11	-13
R	-4	-1	2	0	-2	-4	-6	-8	-10
G	-6	-3	0	2	1	-1	-3	-5	-7
I	-8	-5	-2	1	2	2	0	-2	-4
N	-10	-7	-4	-1	1	2	3	1	-1
A	-12	-9	-6	-3	-1	1	2	4	2
L	-14	-11	-8	-5	-3	-1	1	2	5

Tabelle 2.1.: Needleman-Wunsch-Prozess für die Wörter „Original“ und „Original“ für +1 bei Übereinstimmungen, 0 bei Abweichungen und Gap Penalty $\delta = 2$. Der Weg des Backtrackingprozesses wurde rot markiert.

Nach der Berechnung aller Einträge aus $O[i][j]$ haben wir lediglich den Wert einer optimalen Lösung bestimmt, aber noch nicht diese optimale Lösung selbst. Das geschieht durch einen einfachen Backtrackingprozess, bei dem wir mit $O[n][m]$ starten. Für $O[i][j]$ müssen wir dann nur die Einträge $O[i-1][j-1]$, $O[i-1][j]$ und $O[i, j-1]$ betrachten, um festzustellen, ob $(i, j) \in \mathcal{R}$ oder in welche der beiden Sequenzen in diesem Schritt eine Lücke eingefügt wurde. Ist $O[i][j] - \alpha_{S_1[i-1], S_2[j-1]} = O[i-1][j-1]$, dann wird $(i-1, j-1)$ zum Alignment hinzugefügt. Stimmt hingegen $O[i][j] - \delta = O[i-1, j]$, dann wurde an dieser Stelle eine Lücke in S_1 eingefügt. Der Fall einer Lücke in S_2 funktioniert analog. Wie man sieht ist es auch möglich, dass zwei oder alle drei dieser Fälle eintreten. In diesem Fall gibt es mehr als ein mögliches perfektes paarweises Alignment. In Abbildung 2.1 befindet sich ein Beispiel für den Needleman-Wunsch-Algorithmus.

2.2.5 Lemma

Für zwei Sequenzen S_1 und S_2 kann der Score eines optimalen Alignments \mathcal{R} in $O(n \cdot m)$ Zeit und mit $O(n \cdot m)$ Speicherplatz berechnet werden.

Beweis. Die Korrektheit des Algorithmus 1 folgt aus der Korrektheit der Rekursionsgleichung aus Korollar 2.2.4. Die Laufzeit ergibt sich aus den zwei ineinander geschachtelten for-Schleifen. Diese laufen über je n beziehungsweise m Indizes, ohne dass diese innerhalb der Schleifenläufe verändert werden. Jeder Schleifendurchlauf hat konstante Kosten, da nur das Maximum von $O(1)$ Zahlen bestimmt werden muss, die zuvor in konstanter Zeit berechnet wurden. Aus dem selben Grund folgt auch die Terminierung des Algorithmus. \square

2.2.6 Korollar

Für zwei Sequenzen S_1 und S_2 kann ein optimales Alignments \mathcal{R} in $O(n \cdot m)$ Zeit und $O(n)$ Speicherplatz berechnet werden.

Beweis. Wie zuvor gezeigt kann in der selben Zeit- und Speicherkomplexität der Score eines optimalen Alignments berechnet werden. Mit einem einfachen Backtrackingprozess kann man jetzt feststellen, welche Zuweisungen Teil eines dazugehörigen Alignments sind. Dafür betrachten wir wie oben beschrieben für den Tabelleneintrag $O[i][j]$ die Einträge $O[i-1][j-1]$, $O[i-1][j]$ und $O[i, j-1]$. Man stellt fest, dass in jedem Schritt mindestens einer der beiden Indizes gesenkt wird. Das bedeutet, dass nach höchstens $O(n + m)$

2. Dynamische Programmierung und der Algorithmus von Needleman und Wunsch

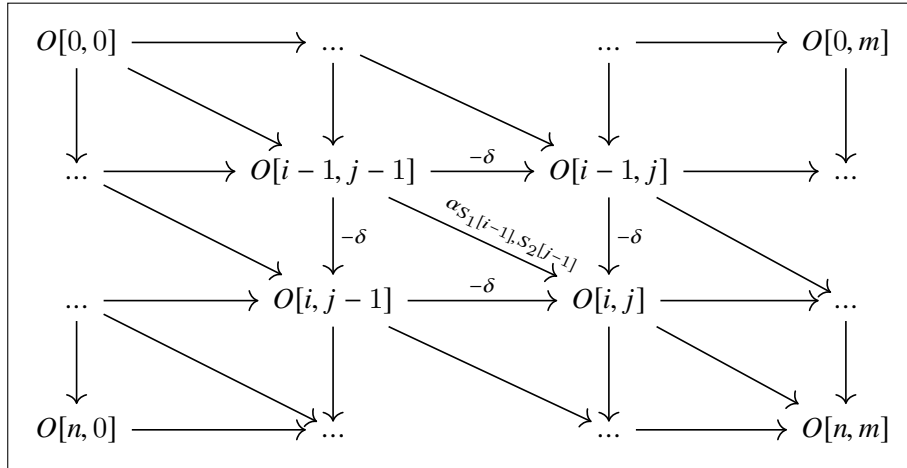


Abbildung 2.1.: Darstellung des Needleman-Wunsch-Prozesses als Graph.

Schritten alle Zuweisungen oder Lücken bestimmt wurden. Jeder einzelne Schritt ist in konstanter Zeit möglich, weil jeweils lediglich drei Tabelleneinträge betrachtet werden müssen. \square

Dan Hirschberg hat einen Algorithmus entwickelt, der den Algorithmus von Needleman und Wunsch mit Hilfe eines Divide-and-Conquer-Ansatzes mit $O(n + m)$ Speicherplatz umsetzt [Hir75]. Diese Verbesserung kann bei langen Sequenzen einen großen Unterschied in der Laufzeit machen, weil es aufgrund des geringeren Speicherverbrauchs zu weniger aufwändigen Seitenfehlern bei der Speicherverwaltung des Betriebssystems kommt. Auf diesen Algorithmus gehen wir hier nicht weiter ein, aber im kommenden Kapitel wird ein ähnlicher Algorithmus zum speicherplatzeffizienten Berechnen von segmentbasierten paarweisen Alignments vorgestellt.

2.3. Komplexität

Als nächstes widmen wir uns der Komplexität des Multiple-Sequence-Alignment-Problems. Diese werden wir nicht formal beweisen, aber anhand des gerade kennengelernten Needleman-Wunsch-Algorithmus anschaulich motivieren. Man kann die Modellierung nach Needleman-Wunsch auch als Graphen interpretieren, bei dem der Algorithmus einen längsten Pfad durch diesen Graphen findet (s. 2.1). Der Graph ist dabei ein tabellenartiger planarer Graph, bei dem alle Knoten mit den dreien nach rechts und unten verbunden sind, falls es diese gibt. Auf den diagonalen Kanten stehen dabei die Gewichte für das Alignieren zweier Symbole der Sequenzen und auf den waage- und senkrechten $-\delta$ für das Einfügen einer Lücke.

Grundsätzlich lässt sich damit das Vorgehen des Algorithmus von Needleman-Wunsch zum Alignieren einer Menge $S = \{S_1, \dots, S_n\}$ von Sequenzen erweitern. Dazu wird jedoch eine n -dimensionale Matrix mit $l_1 \cdot \dots \cdot l_n$ Einträgen benötigt, wobei l_i die Länge der Sequenz S_i ist, beziehungsweise einen Graphen mit derselben Anzahl an Knoten. Für $l_{\max} := \max\{l_1, \dots, l_n\}$, müssen $O((l_{\max})^n)$ Einträge der Matrix berechnet werden. Durch die höhere Anzahl an Sequenzen steigen auch die Kosten für die Berechnung eines einzelnen Eintrags. Betrachten wir beispielsweise die Berechnung eines Eintrags

der Tabelle für drei Sequenzen. In diesem Schritt ist es möglich, in keine der Sequenzen eine Lücke einzufügen und alle drei Symbole miteinander zu alignieren (eine Möglichkeit), in eine der Sequenzen eine Lücke einzufügen (drei Möglichkeiten) oder in zwei der Sequenzen eine Lücke einzufügen (drei Möglichkeiten). In alle Sequenzen eine Lücke einzufügen ergibt in diesem Kontext keinen Sinn, aber man erkennt trotzdem, dass die Anzahl an Möglichkeiten in jedem Schritt in der Größe der Potenzmenge von S , also $O(2^n)$ liegt. Somit folgt eine Laufzeit von $O(2^n \cdot (l_{max})^n)$ für die Berechnung eines optimalen multiplen Alignments mit dem Algorithmus von Needleman-Wunsch. Wang und Jiang haben formal bewiesen, dass es nicht möglich ist, unter angemessenen Einschränkungen ein multiples Alignment in deterministisch polynomieller Zeit zu berechnen [WJ94]. Das Multiple-Sequence-Alignment-Problem ist somit *NP-schwer* mit der Komplexität $O(n^l)$.

Aufgrund dieser Erkenntnis ist es in der Praxis im Allgemeinen nicht möglich, mathematisch exakte multiple Alignments zu berechnen. Wenn man bedenkt, dass es für manche Sequenzanalysen nötig ist, hunderte Sequenzen, die oft mehr als tausend Zeichen lang sind, miteinander zu vergleichen, ist es mit der oben genannten Laufzeit illusorisch, das Verfahren von Needleman und Wunsch anzuwenden. Stattdessen sind wir dazu gezwungen, Heuristiken zu entwickeln, die in angemessener Zeit eine möglichst gute Annäherung an das perfekte Ergebnis liefern. Mit dem DIALIGN-Verfahren von Morgenstern et al. [MDW96] und der graphtheoretischen Erweiterung von Corel et al. [CPM10] werden wir in den folgenden Kapiteln zwei leistungsstarke Heuristiken kennenlernen und analysieren.

3. Das DIALIGN-Verfahren

In diesem Kapitel lernen wir zunächst das DIALIGN-Verfahren für multiple Sequenzalignments nach Morgenstern et al. kennen [MDW96]. Der verwendete Algorithmus wurde im Laufe der Zeit auf verschiedene Weisen angepasst und verbessert. In dieser Arbeit wird die Version 2.2 vorgestellt, die die neueste direkte Weiterentwicklung der ursprünglichen Veröffentlichung ist. Mit DIALIGN-TX gibt es zwar auch noch einen moderneren Nachfolger, aber bei diesem handelt es sich aufgrund von größeren Änderungen, um einen anderen Algorithmus [SKM08b].

Anders als der im letzten Kapitel vorgestellte Algorithmus von Needleman-Wunsch aligniert DIALIGN keine einzelnen Symbole, sondern gleich ganze Segmente der Eingabesequenzen. Das hat zum einen den Vorteil, dass man auf die Kosten zum Einfügen von Lücken verzichten kann und dadurch weitgehend von benutzerdefinierten Eingaben unabhängig wird. Zum anderen ist man so in der Lage, sowohl global als auch lokal verwandte Sequenzen einander auszurichten: Liegen in einem Bereich der Sequenzen keine Segmente vor, die einander ähnlich sind, dann verzichtet man darauf, diese sich gegenseitig zuzuweisen und sie werden nicht Teil des Alignments.

DIALIGN kann genau wie Needleman-Wunsch im Sinne der jeweiligen Zielfunktion mathematisch optimale paarweise Alignments berechnen. Anders als bei letzterem, kann man aber auch mit Hilfe einer Heuristik für drei oder mehr Sequenzen effizient multiple Alignments bestimmen. Der Algorithmus funktioniert im weitesten Sinne wie folgt:

Algorithmus 2 DIALIGN-Algorithmus zur Berechnung eines multiplen Alignments einer Menge von Sequenzen $S = \{S_1, \dots, S_n\}$

Require: Menge S von Sequenzen mit $|S| = n$

```
1: procedure DIALIGN( $S$ )
2:   Weise allen möglichen Fragmenten  $f$  ein Gewicht  $w^*(f)$  zu
3:   Berechne mit dynamischer Programmierung alle möglichen  $\binom{n}{2}$  paarweisen
       Alignments aus  $S$ 
4:   Sortiere alle Fragmente der paarweisen Alignments nach ihrem Gewicht als  $f_1, \dots, f_n$ 
5:    $A \leftarrow \emptyset$  ▷ Initialisiere Ausgabe für Alignment
6:   for  $i = 1$  to  $n$  do
7:     if  $f_i$  ist zu allen bisher gewählten Fragmenten konsistent then
8:        $A \leftarrow A \cup \{f_i\}$  ▷ Füge  $f_i$  zum Alignment hinzu
9:     end if
10:  end for
11:  return  $A$ 
12: end procedure
```

Unter *Konsistenz* können wir uns zunächst informell vorstellen, dass es bei einer Zuweisung weder zu Überkreuzungen kommt, noch dazu, dass ein Symbol einer Sequenz gleichzeitig mehreren einer anderen zugewiesen wird.

3.1. Theoretische Grundlagen

Um multiple Sequenzalignments genauer zu verstehen und die dazu nötigen Algorithmen analysieren zu können, brauchen wir einige Definitionen. Diese sind [MDW96], [AM00] und [CPM10] entnommen. Sei dazu im Folgenden eine n -stellige Menge von Sequenzen S über einem endlichen Alphabet gegeben. Wir bezeichnen die Länge der i -ten Sequenz als L_i .

3.1.1 Definition (Stelle und Stellenraum[CPM10])

Eine *Stelle* ist ein Tupel (i, p) , bei dem $i \in \{1, \dots, n\}$ die Sequenz und $p \in \{1, \dots, L_i\}$ die Position eines Zeichens innerhalb dieser Sequenz angibt.

Als *Stellenraum* bezeichnen wir die Menge aller Stellen über unseren Sequenzen S : $S := \{(i, p) \mid 1 \leq i \leq n, 1 \leq p \leq L_i\}$.

Der Einfachheit identifizieren wir die *Stellen* der i -ten Sequenz als S_i . Auf dem *Stellenraum* existiert eine Halbordnung ' \leq ', wobei $(i, p) \leq (i', p')$ genau dann gilt, falls $i = i'$ und $p \leq p'$ gelten.

Nachdem Alignments und *Konsistenz* bis jetzt nur umgangssprachlich vorgestellt wurden, werden wir diese Begriffe nun formalisiert.

3.1.2 Definition (Alignment und Konsistenz[MDW96])

Ein *Alignment* \mathcal{A} ist eine Äquivalenzrelation auf der Menge S , die das folgende *Konsistenzkriterium* erfüllt. Sei zunächst \mathcal{R} eine beliebige binäre Relation auf S . Wir können diese mit ' \leq ' zu der Präordnung (auch Quasiordnung genannt) $\leq_{\mathcal{R}} = (\leq \cup \mathcal{R})_t$ erweitern, also einer zweistelligen Relation, die reflexiv und transitiv, aber nicht antisymmetrisch ist. Hierbei bezeichnet X_t die transitive Hülle einer Relation X .

Wir bezeichnen \mathcal{R} als *konsistent*, wenn $\leq_{\mathcal{R}} = (\leq \cup \mathcal{R})_t$ die natürliche Ordnung auf jeder Sequenz erhält, also $x \leq_{\mathcal{R}} y \implies x \leq y$ für alle $x, y \in S_i$ und $1 \leq i \leq n$ gilt. Außerdem nennen wir eine Menge von Relationen $\{\mathcal{R}_1, \dots, \mathcal{R}_n\}$ *konsistent*, wenn ihre Vereinigung $\cup_i \mathcal{R}_i$ *konsistent* ist, sowie ein Paar $(x, y) \in S^2$ *konsistent* mit einer Relation \mathcal{R} , falls $\mathcal{R} \cup \{(x, y)\}$ *konsistent* ist.

Für ein Alignment \mathcal{A} und $(x, y) \in S^2$ gilt $x \mathcal{A} y$ genau dann, wenn die Stellen x und y durch \mathcal{A} aligniert werden oder identisch sind.

Im Folgenden wollen wir zwei Beispiele betrachten, um das Konzept der Konsistenz und Alignments besser zu veranschaulichen. Informell können wir uns ein Alignment als eine Relation vorstellen, bei der es weder zu einer Überkreuzung von Zuweisungen kommt, noch zu Fällen, bei denen ein Symbol (transitiv) gleichzeitig mehreren Symbolen aus einer einzigen anderen Sequenz zugewiesen ist.

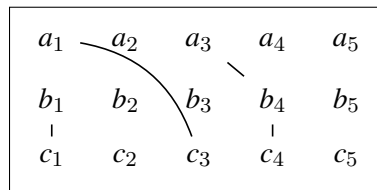


Abbildung 3.1.: Beispiel eines Alignments

Für alle Stellen in Abbildung 3.1, die aus der selben Sequenz stammen, gilt $x \leq_{\mathcal{R}} y \implies x \leq y$, wie beispielsweise für a_1 und a_5 : $a_1 \mathcal{A} c_3, c_3 \leq c_4, c_4 \mathcal{A} b_4, b_4 \mathcal{A} a_3$ und $a_3 \leq a_5$. Es folgt $a_1 \leq_{\mathcal{R}} a_5$. Also ist die Relation auf S konsistent und somit ein Alignment.

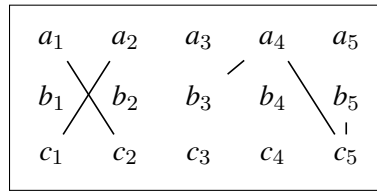
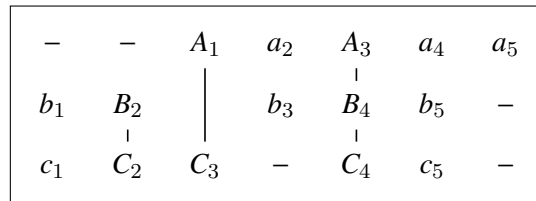


Abbildung 3.2.: Beispiel für eine binäre Relation auf \mathcal{S} , die kein Alignment ist.

In Abbildung 3.2 handelt es sich um kein Alignment, denn die Konsistenz ist gleich an mehreren Stellen verletzt. Erstens gilt $a_2 \leq_{\mathcal{R}} a_1$, denn $a_2 \mathcal{A} c_1, c_1 \leq c_2$ und $c_2 \mathcal{A} c_1$. Da aber $c_1 \leq c_2$ gilt, erhält die Relation die natürliche Ordnung auf der ersten Sequenz nicht. Der Grund ist hier die Überkreuzung von mehreren Zuweisungen. Des Weiteren gilt $b_5 \leq_{\mathcal{R}} b_3$, weil $b_5 \mathcal{A} c_5, c_5 \mathcal{A} a_4$ und $a_4 \mathcal{A} b_3$, aber $b_5 \not\leq b_3$. Hier ist das Problem eine transitive Mehrfachzuweisung von mehreren Symbolen der einen Sequenz auf das gleiche einer anderen (sowohl b_3 als auch b_5 stehen in Relation zu beispielsweise a_4).

Es lässt sich zeigen, dass eine Relation \mathcal{A} genau dann ein Alignment ist, wenn es möglich ist, zwischen den alignierten Symbolen Lücken einzufügen, sodass genau die einander zugewiesenen in Spalten untereinander stehen. Deshalb bezeichnet man die Äquivalenzklassen $[x]_{\mathcal{A}} = \{y \in \mathcal{S} : x \mathcal{A} y\}$ von \mathcal{A} auch als (*Zuweisungs*-)Spalten. Man kann sich leicht überlegen, dass das bei Überkreuzungen und transitiven Mehrfachzuweisungen nicht möglich ist. Im ersten Beispiel 3.1 von oben würde das so aussehen:



Alle Symbole, die Teil einer Zuweisungsspalte sind, also einer Äquivalenzklasse mit mehr als einer Stelle, wurden als Großbuchstabe dargestellt, während die nicht-alignierten kleingeschrieben wurden.

Da DIALIGN ein segmentbasiertes Alignmentverfahren ist, brauchen wir noch eine Bezeichnung für eine paarweise, lückenlose Zuweisung von direkt aufeinanderfolgenden Elementen zweier Sequenzen.

3.1.3 Definition (Fragment[MDW96])

Gegeben seien zwei Sequenzen S_1 und S_2 und ein Alignment \mathcal{A} auf diesen Sequenzen. Dann definieren wir das Fragment mit Länge l , das an den Stellen i in S_1 und j in S_2 endet mit $1 \leq i \leq l(S_1), 1 \leq j \leq l(S_2)$ und $i - l \geq 0 \leq j - l$, als $f_{i,j,l}$, wenn $S_1[i - k] \mathcal{A} S_2[j - k]$ für alle $0 \leq k \leq l - 1$ gilt.

Manchmal werden Fragmente auch als *Diagonals* bezeichnet, weil sie in der Matrix des Needleman-Wunsch-Verfahrens als Diagonale von mehreren aufeinanderfolgenden einander zugeordneten Symbolen stehen würden. Wir können unter einem Alignment auch eine Kette von zueinander konsistenten Fragmenten verstehen.

3.2. Gewichtsfunktionen und Substitutionsmatrizen

Weil es nicht unser Ziel ist ein beliebiges Alignment zu berechnen, sondern ein möglichst gutes, müssen wir in Schritt 2 von Algorithmus 2 zunächst ein Maß für die Ähnlichkeit von zwei Sequenzen festlegen. Dieses kann dann in den nächsten Abschnitte mit Hilfe von dynamischer Programmierung maximiert werden, um möglichst gute Alignments zu konstruieren.

3.2.1. Gewichtsfunktionen in DIALIGN 1

Um zwei Fragmente miteinander vergleichen zu können, müssen wir die Ähnlichkeit zwischen ihnen quantifizieren. Je ähnlicher sich zwei Fragmente sind, desto eher können wir davon ausgehen, dass sie einen gemeinsamen evolutionären Ursprung haben und als desto wichtiger schätzen wir sie für unser Alignment ein. In der ersten Variante von DIALIGN hat man eine starre stochastische Gewichtsfunktion benutzt, indem man davon ausging, dass alle Symbole gleichverteilt mit Wahrscheinlichkeit $p = 0,25$ für DNA und $p = 0,05$ für Proteine auftreten [MDW96]. Das liegt daran, dass es vier verschiedene Nukleinsäuren in der DNA und zwanzig Standard-Aminosäuren gibt.

Wir untersuchen die Ähnlichkeit der zwei Abschnitte eines Fragments, indem wir zuerst die Anzahl an Übereinstimmungen zählen. Danach wird die Wahrscheinlichkeit dafür berechnet, wie wahrscheinlich es ist, dass ein Fragment aus zufällig gewählten Symbolen eine gleich hohe oder höhere Anzahl an Übereinstimmungen hat. Ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dann ist das gewählte Fragment vermutlich Zufall. Ist die Wahrscheinlichkeit für die Anzahl an Übereinstimmungen aber sehr gering, dann ist es sehr unwahrscheinlich, dass die Ähnlichkeit reine Koinzidenz ist und es liegt vermutlich eine Verwandtschaft der Abschnitte vor [MDW96]. Dafür sei nun ein Fragment f der Länge l , mit m in beiden Sequenzen übereinstimmenden Symbolen gegeben. Dann lautet aufgrund der Gleichverteilung die Wahrscheinlichkeit, dass ein solches Fragment der Länge l m oder mehr Übereinstimmungen hat, wie folgt:

$$P(l, m) = \sum_{i=m}^l \binom{l}{i} \cdot p^i \cdot (1-p)^{l-i} \quad (3.1)$$

DIALIGN 1 benutzt als Gewichtsfunktion den negativen Logarithmus von $P(l, m)$. Dadurch ergibt sich ein umso höheres Gewicht, je niedriger die Wahrscheinlichkeit ist, dass das vorliegende Fragment zufällig entstanden ist. Ziel wird es im Folgenden sein die Summe der Gewichte aller Fragmente eines Alignments zu maximieren. Diese bezeichnen wir wieder als Score des Alignments.

$$w(f) := -\ln(P(l, m)) \quad (3.2)$$

3.2.2. Substitutionsmatrizen

Es hat sich jedoch bei der Untersuchung von Proteinsequenzen herausgestellt, dass diese Gewichtsfunktion nicht immer zielführend ist. Nicht alle Aminosäuren sind gleich ähnlich und die Übergangswahrscheinlichkeiten zwischen ihnen können dramatisch verschieden sein. So ist beispielsweise eine Veränderung von Arginin zu Lysin recht wahrscheinlich, während jene von Tryptophan zu Glycin nur sehr selten vorkommt [Pea13].

3.2. Gewichtsfunktionen und Substitutionsmatrizen

Deswegen verwenden wir genau wie bei Needleman-Wunsch Matrizen von Werten α , die die Ähnlichkeit von oder die Übergangswahrscheinlichkeit zwischen Symbolen angibt. Eine solche Matrix α bezeichnen wir als *Substitutionsmatrix* und auch mit ihrer Hilfe kann das Gewicht von Fragmenten berechnet werden. Sei dazu $f_{i,j,l}$ ein Fragment aus den zwei Sequenzen S_1 und S_2 und M eine Substitutionsmatrix. Dann berechnet sich das Gewicht von $f_{i,j,l}$ als die Summe der paarweisen Ähnlichkeitswerte:

$$w(f_{i,j,l}) := \sum_{k=1}^l M[i-l+k, j-l+k] \quad (3.3)$$

Dieses Vorgehen hat einige Vorteile gegenüber der alten Gewichtsrechnung (3.1). Zum einen lässt sich das Gewicht eines Fragments $f_{i,j,l}$ sehr einfach berechnen, wenn das Gewicht des Fragments $f_{i-1,j-1,l-1}$ bereits bekannt ist, indem man einen einzigen Ähnlichkeitswert zur Summe hinzu addiert. Zum anderen kann man die Berechnung vieler Gewichte frühzeitig abbrechen, wenn eine Teilsumme der Ähnlichkeitswerte negativ ist. Dann weiß man, dass ein Alignment mit höherem Score berechnen werden kann, wenn man diesen Teil des Fragments weglässt. Diese beiden Eigenschaften werden wir uns im nächsten Abschnitt über die effiziente Berechnung der paarweisen Alignments zunutze machen.

Nun wollen wir Substitutionsmatrizen und die Theorie dahinter genauer betrachten. Das werden wir anhand der von [HH92] entwickelten BLOcks SUBstitution Matrix (BLOSUM) tun, da andere verbreitete Substitutionsmatrizen ähnlich entstanden sind. Die Matrizen wurden empirisch bestimmt, indem man sich Blöcke von Proteinmotiven anguckt hat, bei denen ein korrektes Alignment bekannt war. Als Block bezeichnen wir einen längeren, zusammenhängenden alignierten Bereich ohne gelöschte oder eingefügte Segmente. Für die Berechnung eines Eintrags der Matrix $M_{i,j}$ brauchen wir die Wahrscheinlichkeiten q_i und q_j , mit der die beiden Aminosäuren auftreten, sowie die Wahrscheinlichkeit $p_{i,j}$, dass gerade diese beide Aminosäuren miteinander aligniert werden.

$$M_{i,j} := \frac{1}{\lambda} \log \left(\frac{p_{i,j}}{q_i \cdot q_j} \right) \quad (3.4)$$

Der Korrekturterm λ wird benutzt, um die Werte auf ganze Zahlen zu runden, die weniger anfällig für Rundungsfehler und andere Ungenauigkeiten in der Computerarithmetik sind. Diese Vorgehensweise wird, da man den Logarithmus einer Wahrscheinlichkeit berechnet, als *log-odd-Verfahren* bezeichnet. Der Eintrag $M_{i,j}$ gibt ein Maß für die Wahrscheinlichkeit an, dass das betrachtete Paar in einem Alignment aus genau diesen beiden Aminosäuren auftritt. Die Wahrscheinlichkeit für eine längere Folge aufeinanderfolgender Paare wird mit der Summe der Einträge berechnet. Das funktioniert aufgrund der Rechenregeln des Logarithmus: $\log(p_1 \cdot p_2) = \log(p_1) + \log(p_2)$. Für die Berechnung der ursprünglichen Wahrscheinlichkeiten reicht es die Summe der Ähnlichkeitswerte zu exponenzieren.

[HH92] haben mehrere Substitutionsmatrizen entwickelt. Die Zahl hinter jeder BLOSUM gibt die Ähnlichkeit der zur Berechnung der Matrix verwendeten Proteinsequenzen an. Für die BLOSUM62 wurden beispielsweise nur Blöcke benutzt, bei denen es eine Ähnlichkeit von höchstens 62% gab. Im Allgemeinen wird dazu geraten, BLOSUMs mit geringen Suffixen wie beispielsweise BLOSUM45 zum Alignieren von entfernt verwandten, mit großen wie BLOSUM80 für eng verwandte und BLOSUM62 für durchschnittlich eng verwandte Sequenzen zu benutzen. Im AnhangA befindet sich die BLOSUM62 von Henikoff und Henikoff aus der Originalveröffentlichung.

3. Das DIALIGN-Verfahren

Bei DNA wird meistens nur eine zwischen Treffern und Nichttreffern unterschieden. Als Substitutionsmatrix entspräche dies der Einheitsmatrix. Dies hat aber den Nachteil, dass alle Fragmente positive Gewichte haben und damit potentiell für unser Alignment in Betracht kommen. Besser sind positive Werte für ähnliche und negative für sehr unähnliche Abschnitte, weil sich so der Rechenaufwand verringern lässt. Außerdem kann man mit Matrizen, die dem Einsatzgebiet angepasst sind, oft bessere Ergebnisse erzielen. Nach Pearson sind die Ähnlichkeiten zwischen zu vergleichenden DNA-Sequenzen deutlich größer, als bei Proteinen[Pea13]. Sie betragen zwischen homologen menschlichen DNA-Abschnitten etwa 99,9% und bei proteinkodierenden Regionen zwischen Mensch und Maus immer noch 80%, während Ähnlichkeiten von unter 50%, anders als bei Proteinen, quasi nicht mehr zu entdecken sind. Untersuchungen haben ergeben, dass die Substitutionsmatrix mit (+1/-3) für Treffer und Nichttreffer bei Sequenzen mit 99% Übereinstimmung die besten Alignments liefern. Diese Matrix bestraft Punktmutationen sehr stark, weil es in einem Fragment dreimal so viele Treffer wie Nichttreffer geben muss, für eine positives Gewicht. Bei 90% Übereinstimmung liefert die (+2/-3)-Matrix die besten Ergebnisse und bei 70% die (+5/-4)-Matrix.

Es lässt sich nicht abstreiten, dass die Wahl der richtigen Substitutionsmatrix dem Henne-Ei-Problem ähnelt: um die Ähnlichkeit von zwei Sequenzen zu bestimmen, müssen wir sie mit der passenden Matrix alignieren. Für die Wahl der richtigen Substitutionsmatrix sollten wir jedoch wissen, wie ähnlich sich die beiden Sequenzen sind.

Wann genau sich die Berechnung der Gewichte in DIALIGN verändert hat, steht leider in keiner Veröffentlichung, auch wenn sie bereits in [MDW96] als kommende Ergänzung in Betracht gezogen wurde. Spätestens bei DIALIGN TX, der neuesten Version des Algorithmus, wird diese Technik jedoch angewendet [SKM08a]. Dort dient eine modifizierte BLOSUM 62, die nur nicht-negative Werte enthält, als Matrix für Proteinsequenzen, während bei DNA lediglich die Einheitsmatrix benutzt wird.

3.2.3. Gewichtsfunktionen in DIALIGN 2

In der ursprünglichen Version von DIALIGN gab es einen benutzerdefinierten Parameter T , der das minimale Gewicht eines in Betracht zu nehmenden Fragments angab. Dieser wurde eingeführt, damit nicht kleine, zufällige Übereinstimmungen ihren Weg in das Alignment finden. Das Wichtigste für ein gutes Alignment ist, dass verwandte, also homologe, Abschnitte miteinander aligniert werden. Fast genauso wichtig ist es aber, dass es zu keinen Zuordnungen kommt, wenn keine Verwandtschaft vorliegt. Bei Tests mit DIALIGN 1 hat man jedoch festgestellt, dass ein Großteil der ausgewählten Fragmente nur knapp über der Gewichtsgrenze T lagen und wenn diese gesenkt wurde, sank auch das Gewicht der Fragment [MAHD98].

Das liegt daran, dass die Gewichtsfunktion w einem langen Fragment f quasi das gleiche Gewicht zuordnet, wie die Summe der Gewichte der Teilfragmente f_1, \dots, f_n , wenn f auf diese aufgeteilt wird. Das sorgt dafür, dass sich oft bessere Scores ergeben, wenn größere Fragmente aufgeteilt und dazwischen einzelne Regionen mit geringen Übereinstimmungen weggelassen werden, statt die großen Fragmente selbst auszuwählen. Neben der Abhängigkeit vom willkürlichen Parameter T und der Tendenz kleine, unbedeutende Übereinstimmungen auszuwählen, hat dies auch den Nachteil, dass die rechenintensive Aktualisierung der Konsistenzgrenzen öfter durchgeführt werden muss.

Deshalb ist man in DIALIGN 2 dazu übergegangen, statt der Wahrscheinlichkeit $P(l, m)$,

3.3. Paarweise Alignments mit dynamischer Programmierung

dass in einem Fragment der Länge l mindestens m Übereinstimmungen auftreten, zu berechnen, wie wahrscheinlich es ist, dass in den beiden Gesamtsequenzen S_1 und S_2 mit Längen l_1 respektive l_2 überhaupt eine Sequenz mit Länge l und m Übereinstimmungen auftritt.

$$P^*(l, m) \approx l_1 \cdot l_2 \cdot P(l, m) \quad (3.5)$$

Als neue Gewichtsfunktion w^* ergibt sich dann mit $K := \log(l_1) + \log(l_2)$:

$$w^*(f) := w(f) - K \quad (3.6)$$

Wenn man f nun in f_1, \dots, f_n aufteilt, wird der Korrekturterm K nicht nur einmal, sondern n -mal abgezogen. Das sorgt dafür, dass tendenziell längere Fragmente ausgewählt werden [Mor99]. Ein weiterer Vorteil ist, dass der Erwartungswert des Gewichts eines zufälligen Fragments nicht mehr 1, sondern 0 ist. Dadurch haben alle Abschnitte mit unterdurchschnittlicher Ähnlichkeit automatisch negative Gewichte und wir haben eine einfache und schnelle Möglichkeit zu entscheiden, ob ein Fragment weiter für unser Alignment in Betracht gezogen werden muss.

Wie sich der Effekt von w^* auswirkt, wenn eine Substitutionsmatrix benutzt wird, die einem zufälligen Fragment im Schnitt ein negatives Gewicht zuordnet, müsste man empirisch feststellen. Möglicherweise ist es in dem Fall besser, auf den Korrekturterm K zu verzichten und nur mit einer Substitutionsmatrix wie beispielsweise BLOSUM62 zu arbeiten. Mit einer (+2/-3)-Matrix ergibt sich beispielsweise ein Erwartungswert von $E(w(f_{i,j,l})) = (\frac{3}{4} \cdot (-3) + \frac{1}{4} \cdot 2) \cdot l = -\frac{7}{4} \cdot l$ für ein zufälliges DNA-Fragment der Länge l . Ein anderer Ansatz verbindet die Substitutionsmatrix mit dem Korrekturterm K , indem wir wie DIALIGN TX eine Substitutionsmatrix benutzen, die aber keine negativen Werte enthält. Dafür ziehen wir aber weiterhin K vom Gewicht ab.

3.3. Paarweise Alignments mit dynamischer Programmierung

Nachdem wir uns jetzt genauer mit den Gewichten von Fragmenten beschäftigt haben, können wir uns der Berechnung der paarweisen Alignments mit Hilfe von dynamischer Programmierung widmen. Dabei beziehen wir uns, außer wenn anders gekennzeichnet, auf die speichereffiziente Umsetzung aus DIALIGN 2.2, die in [Mor02] vorgestellt wurde.

Wie bei dynamischer Programmierung üblich, stellen wir zunächst eine Rekursionsgleichung auf. Sei dazu $Sc[i, j]$ der maximal mögliche Score aller Fragmente bis zu den Elementen $S_1[i]$ und $S_2[j]$ zweier Sequenzen S_1 und S_2 . An dieser Stelle tritt sehr ähnlich zu Needleman-Wunsch eine von drei Situationen auf: Die ersten beiden Möglichkeiten sind, dass wir die Stelle $(1, i)$ oder die Stelle $(2, j)$ nicht zu unserem Alignment hinzufügen. Oder aber wir wählen ein Fragment $f_{i,j,l}$ aus, das in (i, j) endet. In diesem Fall wählen wir genau das aus, welches den Score aller in (i, j) endenden Alignments maximiert. Welcher der drei Fälle der richtige ist, um den höchstmöglichen Score bis (i, j) zu berechnen, erfahren wir, indem das Maximum von ihnen bestimmt wird.

$$Sc[i, j] = \max \begin{cases} Sc[i-1, j], \\ Sc[i, j-1], \\ \max_{l \geq 1} \{Sc[i-l, j-l] + w^*(f_{i,j,l})\} \end{cases} \quad (3.7)$$

3. Das DIALIGN-Verfahren

3.3.1 Satz ([Mor02])

Mit der obigen Rekursionsgleichung (3.7) lässt sich ein optimales paarweises Alignment zweier Sequenzen mit Längen L_1 und L_2 in $O(L^3)$ Zeit und $O(L^2)$ Speicherplatz berechnen für $L = \max(L_1, L_2)$. Außerdem gilt für die Menge der möglichen Fragmente $F: |F| \in O(L^3)$.

Beweis. Insgesamt müssen wir $L_1 \cdot L_2 \in O(L^2)$ -viele Tabelleneinträge berechnen, die wir im Allgemeinen auch gleichzeitig im Speicher vorhalten. Für jeden zu berechnenden Eintrag $Sc[i, j]$ brauchen wir Zugriffe auf $(\min(i, j) + 2)$ -viele Einträge in der Matrix und müssen $\min(i, j)$ Gewichte neu berechnen. Dabei dominiert die Berechnung der Gewichte, wobei jedes Gewicht nur genau einmal berechnet werden muss (für den Score des Tabelleneintrags, in dem das Fragment endet). Im schlimmsten Fall gilt $L_1 = L_2$. Dann gibt es Fragmente der Länge 1 mit jeweils L möglichen Endpunkten in S_1 und S_2 , der Länge zwei mit jeweils $L - 1$ möglichen Endpunkten und so weiter. Die Anzahl aller Fragmente $|F| = \sum_{k=0}^{L-1} (L - k)^2 = \frac{1}{6} \cdot L(2L^2 + 3L + 1) \in O(L^3)$ und die naiv berechnete Anzahl der Zugriffe ist $\sum_{k=0}^{L-1} (L - k)^2 \cdot k = \frac{1}{12} \cdot (L - 1)L^2(L + 1) \in O(L^4)$. Glücklicherweise kann man das Gewicht jedes Fragments $f_{i,j,l}$ in $O(1)$ Zeit aus $f_{i,j,l-1}$ berechnen, denn $w^*(f_{i,j,l}) = w^*(f_{i,j,l-1}) + M[i-l+1, j-l+1]$, wodurch sich die Laufzeit auf $O(L^3)$ verkleinern lässt. \square

Um nicht nur den Score eines perfekten paarweisen Alignments berechnen zu können, sondern auch dieses Alignment selbst, müssen wir zunächst noch einige Definitionen einführen. Zuerst definieren wir für ein Fragment $f \in F$ das *Präfixgewicht* $W(f)$, das die maximale Summe der Gewichte einer Kette $f_1 \ll \dots \ll f_M = f$ von aufeinanderfolgenden Fragmenten bezeichnet, die mit f endet. Wir können uns dieses Gewicht als maximalen Score eines paarweisen Alignments vorstellen, in dem f als letztes Fragment vorkommt.

$$W(f) := \max \left\{ \sum_{k=0}^M w^*(f_k) : f_1 \ll \dots \ll f_M = f \right\} \quad (3.8)$$

3.3.2 Definition (Vorgänger [Mor02])

Sei $f_1 \ll \dots \ll f_M$ eine Kette von Fragmenten, die das Maximum der vorherigen Gleichung erreicht. Dann bezeichnen wir $P(f) = f_{M-1}$ als den *Vorgänger* von f . Außerdem sei $Pr[i, j]$ das letzte Fragment einer optimalen Kette aus (3.8), die spätestens in (i, j) endet.

Jetzt können wir für ein Fragment $f \in F$, das in (i, j) startet, das Gesamtgewicht und den Vorgänger genau definieren. Das Präfixgewicht ist genau das Gewicht von f addiert mit dem Score der Fragmente, die vor f stehen. $P(f)$ und $Pr[i, j]$ sind streng genommen nicht wohldefiniert und es könnte mehrere Fragmente mit diesen Eigenschaften geben. Wie auch schon in DIALIGN 1 wählen wir dann das in den Sequenzen am weitesten rechts stehende aus [MDW96].

$$W(f) = Sc[i-1, j-1] + w^*(f) \quad (3.9)$$

3.3. Paarweise Alignments mit dynamischer Programmierung

Der Vorgänger von f ist das letzte Element einer Kette von Fragmenten, die vor f enden.

$$P(f) = Pr[i-1, j-1] \quad (3.10)$$

Damit können wir jetzt Rekursionsgleichung (3.7) mit unseren neuen Definitionen umformulieren, denn der dritte Fall der obigen Gleichung ist genau das maximale Präfixgewicht eines Fragments, das in (i, j) endet. Diese Umformulierung erlaubt uns mit Algorithmus 2 eine speichereffiziente Berechnung von paarweisen Alignments.

$$Sc[i, j] = \max \begin{cases} Sc[i-1, j], \\ Sc[i, j-1], \\ \max W(f) : f \text{ endet in } (i, j) \end{cases} \quad (3.11)$$

Analog zu den Fällen von $Sc[i, j]$ können wir jetzt auch $Pr[i, j]$ setzen. Das letzte Fragment einer optimalen Kette bis (i, j) ist das selbe wie bei $(i-1, j)$ beziehungsweise $(i, j-1)$, wenn diese in keinem dieser beiden Stellenpaare endet. Endet sie hingegen in (i, j) , dann ist das gesuchte Fragment das, welches das Präfixgewicht aller in (i, j) endenden Fragmente maximiert.

$$Pr[i, j] = \begin{cases} Sc[i-1, j], & \text{falls } Sc[i, j] = Sc[i-1, j] \\ Sc[i, j-1], & \text{falls } Sc[i, j] = Sc[i, j-1] \\ \hat{f}, & \text{falls } Sc[i, j] = \max \{W(f) : f \text{ endet in } (i, j)\} \end{cases} \quad (3.12)$$

Hier gilt $\hat{f} = \operatorname{argmax}\{W(f) : f \text{ endet in } (i, j)\}$. Jetzt stehen uns alle Informationen zur Verfügung, um neben dem Score einer optimalen Kette von Fragmenten auch diese selbst zu berechnen. Zunächst sei $f_{\max} = \operatorname{argmax}_{f \in F}(W(f))$ das letzte Element dieser Kette. Man erhält es, indem man sich das letzte Element einer optimalen Kette anguckt, die bis ganz ans Ende von S_1 und S_2 reichen kann: $f_{\max} = Pr[L_1, L_2]$. Mit einem Backtrackingalgorithmus sind wir nun in der Lage, das optimale paarweise Alignment zu berechnen, indem wir mit f_{\max} starten und immer den direkten Vorgänger des aktuellen Fragments auswählen.

$$f_0 = f_{\max} \text{ und } f_{k+1} = P(f_k) \quad (3.13)$$

Wenn es keinen solchen Nachfolger mehr gibt, dann wurde die Menge von aufeinanderfolgenden Fragmenten gefunden, die den Score maximiert und somit ein gutes paarweises Alignment liefert.

3.3.1. Speichereffiziente Berechnung der paarweisen Alignments

In diesem Abschnitt beschäftigen wir uns mit einer sehr speichereffizienten und schnellen Umsetzung des soeben gesehenen Ansatzes. Speichereffizienz ist wichtig, weil die zu alignierenden Sequenzen sehr lang werden können. Die Verringerung des benötigten Speichers erlaubt die volle Ausnutzung von kleinem, aber schnellem Speicher in der Speicherhierarchie und die Vermeidung von kostenintensiven Seitenfehlern.

Zunächst beschränken wir die maximale Länge eines Fragments l_{\max} auf eine kleine, feste Zahl, beispielsweise 40. Je nach gewünschter Genauigkeit und benötigter Geschwindigkeit kann man diesen Wert vergrößern oder verkleinern. Auch wenn diese Einschränkung den maximal zu erreichenden Score senkt und wir daher keine perfekten Alignments

3. Das DIALIGN-Verfahren

mehr berechnen, hat l_{\max} in der Praxis kaum einen Einfluss auf die Güte der Ergebnisse. Das liegt daran, dass wir im Fall von geringen Ähnlichkeiten zwischen Sequenzen nur selten Fragmente mit Längen haben, die l_{\max} überschreiten und im Fall von sehr ähnlichen Sequenzen können wir lange Fragmente auch in mehrere kleinere in der Größenordnung unserer Begrenzung aufteilen. Wir werden zeigen, dass mit dieser Einschränkung ein paarweises Alignment in $O(L^2)$ Zeit und $O(L + N_{\max})$ Speicherplatz berechnet werden kann, wobei N_{\max} die Anzahl an gleichzeitig gespeicherten Fragmenten ist, die durch $|F|$ begrenzt wird [Mor02].

Algorithmus 3 Speichereffizientes paarweises DIALIGN

Require: Zwei Sequenzen S_1 und S_2 mit den Längen L_1 und L_2

```

1: procedure PAIRWISEALIGNMENT( $S_1, S_2, l_{\max}$ )
2:   for  $i \leftarrow 0$  do  $L_1$ 
3:      $Sc[i, 0] \leftarrow 0$ 
4:   end for
5:   for  $j \leftarrow 1$  to  $L_2$  do
6:     for  $i \leftarrow 1$  to  $L_1$  do
7:       for  $l \leftarrow 1$  to  $l_{\max}$  do
8:          $W(f_{i+l,j+l,l}) \leftarrow w^*(f_{i+l,j+l,l}) + Sc[i-1, j-1]$ 
9:          $P(f_{i+l,j+l,l}) \leftarrow Pr[i-1, j-1]$ 
10:         $F_{j+l} \leftarrow F_{j+l} \cup f_{i+l,j+l,l}$   $\triangleright$  Speichere Fragment für Spalte, in der es endet
11:      end for
12:       $Sc[i, j] = \max \begin{cases} Sc[i-1, j], \\ Sc[i, j-1], \\ \max W(f) : f \text{ endet in } (i, j) \end{cases}$ 
13:      Setze  $Pr[i, j]$  analog zu  $Sc[i, j]$ 
14:      Lösche  $Sc[i, j-1]$  und  $Pr[i, j-1]$   $\triangleright$  Lösche alte Spalteneinträge
15:      for all  $f_{i,j,k} \in F_j$  mit  $f \neq Pr[i, j]$  do
16:        lösche  $F_{i,j,k}$   $\triangleright$  Lösche die, die in keiner opt. Kette in  $(i, j)$  enden
17:      end for
18:    end for
19:  end for
20:   $f_0 \leftarrow Pr[L_1, L_2]$ 
21:  while  $f_k \neq \text{NIL}$  do  $\triangleright$  Backtracking, um Alignment zu bestimmen
22:     $f_{k+1} \leftarrow P(f_k)$ 
23:     $k \leftarrow k + 1$ 
24:  end while
25: end procedure

```

Der Algorithmus 3 geht die Scorematrix Sc Spalte für Spalte von links nach rechts durch (Zeile 5 bis 19). An jeder Position (i, j) berechnet er mit (3.9) und (3.10) $W(f)$ und $P(f)$ für alle Fragmente $f \in \{f_{i+k,j+k,k} : 1 \leq k \leq l_{\max}\}$, die an der Stelle (i, j) beginnen (Zeile 8 und 9). Dabei speichern wir Verweise auf $W(f)$ und $P(f)$ in den Listen F_{j+k} , die mit der Spalte $j + k$ assoziiert werden, in denen die jeweiligen Fragmente enden. Alles, was wir dafür an Informationen benötigen, sind $Sc[i-1, j-1]$ und $Pr[i-1, j-1]$. Deshalb müssen wir nicht permanent die ganze Matrix vorhalten, sondern benötigen nur die zuletzt berechnete und die aktuelle Spalte für Sc und Pr , also vier eindimensionale Arrays der Länge L_1 .

3.3. Paarweise Alignments mit dynamischer Programmierung

Bevor wir zur $(j + 1)$ -ten Spalte übergehen, berechnen wir alle Einträge von 1 bis i für die j -te Spalte. Dazu greifen wir auf die Werte der vorhergehenden Spalte $(j - 1)$ und auf die zuvor gespeicherten Listen aller Fragmente F_j zu, die in der j -ten Spalte enden, wobei wir die Formeln (3.11) und (3.12) benutzen. Man kann sich überlegen, dass für jeden Eintrag (i, j) höchstens $l_{\max} \in O(1)$ Fragmente gespeichert wurden. Sobald wir mit der Berechnung der j -ten Spalte fertig sind, können wir die Werte von $Pr[i, j-1]$ und $Sc[i, j-1]$ für $1 \leq i \leq L_1$ löschen.

Diesen Vorgang wiederholen wir, bis wir schlussendlich auch alle Werte der letzten, also L_2 -ten, Spalte berechnet haben. Dann kennen wir mit $Sc[L_1, L_2]$ den Score des paarweisen Alignments und können mithilfe der Backtrackingprozedur (3.13) die Fragmente, aus denen es besteht, bestimmen. Dazu brauchen wir die Mengen F_j , deren Einträge aber glücklicherweise nicht alle dauerhaft gespeichert werden müssen. Sobald $Sc[i, j]$ und $Pr[i, j]$ für eine Position (i, j) berechnet wurden, können wir alle Fragmente, die dort enden, löschen, abgesehen von $Pr[i, j]$, für das immer noch in Frage kommt, Teil der optimalen Kette von Fragmenten zu sein (Zeile 14). Sollte $Pr[i, j]$ nicht in (i, j) enden, können wir sogar alle Einträge aus F_j löschen, die in Zeile i enden.

Da wir wissen, dass nur Fragmente mit positiven Gewichten Teil unseres Alignments sein können, sind wir in der Lage die Mengen F_j von gespeicherten Fragmenten weiter einzuschränken. Ist die Teilsumme von Ähnlichkeitswerten bis zu einem bestimmten Punkt negativ, können wir den Durchlauf von Zeile 3.7 sofort abbrechen, weil wir wissen, dass wir ein besseres Alignment finden, wenn wir den Teil mit der negativen Summe von Gewichten ignorieren. Außerdem gibt es zwei Situationen bei denen wir die Berechnung der Gewichte für Fragmente zwar nicht abbrechen, aber wissen, dass das aktuell betrachtete Element nicht gespeichert werden muss:

- Bei negativem Gewicht: Es kann beispielsweise sein, dass $w(f)$ zwar positiv ist, aber $w^* = w(f) - K < 0$ gilt. Dann kann dieses Fragment den Score zwar nicht erhöhen, aber möglicherweise ist es Teil eines größeren Fragments, das zum finalen optimalen Alignment gehört.
- Wenn das Gewicht kleiner ist, als das größte bisher gefundene eines Fragments, das in (i, j) startet. In diesem Fall wissen wir, dass Ersteres auf jeden Fall ein besseres Alignment liefern würde.
- Bei DNA, weil es dort nur Übereinstimmungen oder Abweichungen zwischen einzelnen Basen gibt: Wenn das Residuenpaar direkt hinter dem Ende des aktuellen Fragments einen positiven Ähnlichkeitswert hat, bedeutet das, dass dieses auf jeden Fall bessere Ergebnisse liefert und wir das aktuelle nicht speichern müssen. Im Programm können wir dies so umsetzen, dass wir das Fragment $f_{i+l, j+l, l}$ erst dann zu F_{j+l} hinzufügen, wenn wir im nächsten Durchlauf der Schleife in Zeile 3.7 für die jeweilige Zeile kein Fragment mit einem größeren Gewicht finden. Auf diese Art und Weise suchen wir quasi nach lokalen Maxima der Fragmentgewichte und speichern nur diese. Bei Proteinsequenzen funktioniert dieses Vorgehen nicht, weil es sein könnte, dass es für eins der beiden Symbole weiter hinten in der jeweils anderen Sequenz einen besseren Partner mit höherem Ähnlichkeitswert gibt. In diesem Fall müssen wir das zuerst gefundene, kürzere Fragment speichern und gegebenenfalls später zum Alignment hinzufügen.

Guckt man sich Zeile 3.12 genauer an, stellt man fest, dass man gar nicht alle Fragmente

3. Das DIALIGN-Verfahren

kennen muss, die in (i, j) enden. Es reicht das zu kennen, welches das Präfixgewicht $W(f)$ aller dort endenden Ketten maximiert. Anstatt alle dieser Fragmente in F_j zu speichern reicht es zu überprüfen, ob der dritte Fall von Zeile 3.12 eintritt und erst dann in Zeile 3.10 zu sichern. Das bedeutet, dass wir keine ganze Liste von Fragmenten für jede Stelle unserer Tabelle speichern müssen, sondern nur ein einziges.

Widmen wir uns nun N_{\max} , der Anzahl an Fragmenten, die maximal gleichzeitig gespeichert werden. Diese Anzahl wird gleich für die Berechnung des Speicherbedarfs benötigt. Die Anzahl an gesicherten Fragmenten, die wir noch nicht für $Sc[i, j]$ betrachtet haben, beträgt $l_{\max} \cdot L_1 \in O(L)$, weil wir für jede der nächsten l_{\max} Spalten und dort jede der L_1 -vielen Zeilen das Fragment speichern, das $W(f)$ für alle dort endenden maximiert. Zusätzlich wird die Reihe von Vorgängern für jeden aktuellen Tabelleneintrag der Spalte gesichert, indem wir in $Pr[i, j]$ einen Verweis auf das letzte Fragment einer optimalen Kette für die Teilsequenzen bis zu den Stellen i und j in den beiden Sequenzen speichern (Zeile 13). Dieses wiederum speichert einen Pointer auf seinen eigenen Vorgänger und so weiter. Im schlimmsten Fall befinden wir uns in der letzten Spalte der Tabelle und die in den Einträgen endenden optimalen Ketten sind alle unabhängig voneinander. Dann kann es sein, dass diese jeweils aus $O(L_2)$ nah aufeinanderfolgenden Fragmenten der Länge $O(1)$ bestehen. In diesem Fall ist $N_{\max} \in O(L^2)$, genau wie der insgesamt benötigte Speicherplatz. In der Praxis kann man aber erwarten, dass N_{\max} deutlich kleiner ist.

[Mor02] hat sein Verfahren mit verschiedenen Sequenzen getestet. Dabei hat er festgestellt, dass N_{\max} für unabhängige zufällig erstellte Sequenzen im Vergleich zur Größe L zu vernachlässigen ist. Selbst wenn sehr ähnliche Sequenzen miteinander aligniert wurden, befand sich N_{\max} in der Größenordnung von $L \cdot l_{\max}$. So gesehen bietet dieser Ansatz einen großen Vorteil gegenüber der naiven Umsetzung der Rekursionsformel für paarweise Alignments.

3.3.2. Laufzeit

3.3.3 Satz ([Mor02])

Ein paarweises optimales Alignment zwischen zwei Sequenzen S_1 und S_2 mit Längen L_1 und L_2 , gegeben eine maximale Fragmentlänge $l_{\max} \in O(1)$, lässt sich in $O(L^2)$ Zeit berechnen für $L = \max\{L_1, L_2\}$.

Beweis. Das Allokieren des Speicherplatzes für die vier Tabellenspalten (je zwei für $Sc[i, j]$ und $Pr[i, j]$) und das Initialisieren der ersten Spalten benötigt $O(L)$ Zeit. Das Berechnen der Vorgänger und Präfixgewichte sowie das Speichern in F_j der in (i, j) startenden Fragmente benötigt pro Tabelleneintrag $O(1)$ Zeit, da ihre Länge durch l_{\max} beschränkt ist. $Sc[i, j]$ und $Pr[i, j]$ lassen sich auch jeweils in konstanter Zeit berechnen, da wir nur das Maximum von drei Werten bestimmen müssen. Sollte nicht das Fragment gewählt werden, welches das Präfixgewicht aller in (i, j) endenden Fragmente maximiert, löschen wir diesen einzelnen Eintrag in $O(1)$ Zeit. Dies wird für jeden möglichen der $L_1 \cdot L_2 \in O(L^2)$ Tabelleneinträge berechnet, was auch die Laufzeit der geschachtelten for-Schleifen ist.

Der Backtrackingprozess zur Berechnung des optimalen Alignments ist in $O(L)$ Zeit möglich, da wir lediglich der Kette von Verweisen auf den jeweiligen Vorgänger folgen müssen, bis wir am Anfang der Sequenzen angelangt sind. Weil die Länge jedes Fragments in $O(1)$ ist, kann es somit bis zu $O(L)$ Fragmente im Alignment geben. Bei den Verweisen auf die Vorgänger kann es zu keinen Zyklen kommen, weil der Vorgänger auf jeden Fall

endet, bevor das gerade betrachtete Element beginnt. Somit folgt die behauptete Laufzeit von $O(L^2)$. \square

Da wir Alignments zwischen allen $\binom{n}{2} \in O(n^2)$ -vielen Paaren mit jeweils $O(L^2)$ Laufzeit berechnen müssen, erhalten wir für die paarweisen Alignments insgesamt eine Laufzeit von $O(n^2 \cdot L^2)$.

3.3.3. Beispiel zur Berechnung paarweiser Alignments

Um das DIALIGN-Verfahren, das diese Bachelorarbeit behandelt, genauer zu verstehen, widmen wir uns jetzt einem Beispiel mit vier DNA-Sequenzen. Zu diesen werden wir im Lauf der Kapitel immer wieder zurückkehren und an ihnen die verschiedenen Schritte von DIALIGN und dem graphtheoretischen Ansatz von Corel et al. der Reihe nach durchführen.

1. ADGTCTCA
2. GTCADCTCA
3. TATCADGG
4. DGTCADATC

Als erstes berechnen wir nach dem oben beschriebenen Algorithmus ein paarweises Alignment zwischen den ersten beiden Sequenzen. Dazu nehmen wir eine Substitutionsmatrix mit +3 für Übereinstimmungen und -1 für Abweichungen. Der Korrekturterm $K = \ln(L_i) + \ln(L_j)$ aus unserer Gewichtsfunktion w^* beträgt für alle Sequenzpaare gerundet 4. Um die Übersichtlichkeit zu wahren, werden hier nur ein Zwischenschritt und das Endergebnis vorgestellt. Das komplette Beispiel befindet sich in Anhang B.

Für jedes Symbol der zweiten Sequenz wird der Reihe nach jedes Symbol der ersten Sequenz betrachtet. Dabei werden zunächst Fragmente für später im Feld $F_j[i']$ gespeichert, die an der aktuellen Stelle (i, j) starten. Um Speicherplatz zu sparen, wird ihr Präfixgewicht mit dem des aktuell gespeicherten Element verglichen und falls es höher ist, stattdessen gespeichert (Schleife beginnend bei Zeile 7). Danach wird der Score $Sc[i][j]$ gesetzt, indem das Fragment betrachtet wird, das an in (i, j) endet und das maximale Präfixgewicht hat. Ist dieses höher, als der Score, wenn man das letzte Element einer der beiden Teilsequenzen ignoriert ($Sc[i-1, j]$ oder $Sc[i, j-1]$), dann wird dieses Fragment gespeichert. Ist das nicht der Fall, dann wird es verworfen und stattdessen der maximale benachbarte Tabelleneintrag übernommen (Zeile 12). Betrachten wir die Tabelle für $j = 2$:

	$Sc[i, j]$	$Pr[i, j]$	ADGTCTCA GTCADCTCA
i \ j	1 2	1 2	Hier beginnende Fragmente und Kommentare
0	0 0	NIL NIL	
1	" "	" "	
2	" "	" "	
3	" "	" "	
4	" 2	" $f_{4,2,2}$	$F_3[5]$ wird nicht aktualisiert.
5	" "	" "	
6	" "	" "	$F_4[8] = \{f_{4,8,3}, W(f = 5, P(f) = \text{NIL})\}$
7	" "	" "	
8	" "	" "	

3. Das DIALIGN-Verfahren

Das gerade betrachtete Symbol ist das T an zweiter Stelle der zweiten Sequenz. Für $i = 4$ wird $F_3[5]$ nicht aktualisiert. In (4, 2) startet zwar das Fragment $\begin{pmatrix} TC \\ TC \end{pmatrix}$ mit Gewicht 2, aber an der Stelle ist bereits das Fragment $\begin{pmatrix} GCT \\ GTC \end{pmatrix}$ mit höherem Präfixgewicht gesichert. Stattdessen wird aber in $F_4[8]$ das Fragment $f_{4,8,3} \begin{pmatrix} TCA \\ TCA \end{pmatrix}$ vorgemerkt. Dieses hat ein Präfixgewicht von 5 aufgrund von drei Übereinstimmungen und keiner Abweichung. Weil es kein Fragment mit positivem Gewicht gab, das vor (6, 2), dem Startpunkt von $f_{4,8,3}$, endete, wird kein Vorgänger gesetzt.

Nachdem alle in Fragmente betrachtet wurden, die in der zweiten Spalte starten, werden die Einträge der Scores und Vorgänger aktualisiert. Aktuell sind diese noch leer. An der Stelle (4, 2) endet das Fragment $\begin{pmatrix} GT \\ GT \end{pmatrix}$ mit Präfixgewicht 2. Diesen Score speichern wir und übernehmen ihn auch für die unteren Tabelleneinträge der zweiten Spalte, weil kein dort endendes Fragment mit höherem Präfixgewicht gefunden wurde.

	$Sc[i, j]$		$Pr[i, j]$		ADGTCTCA GTCADCTCA
$i \backslash j$	8	9	8	9	Hier beginnende Fragmente und Kommentare
0	0	0	NIL	NIL	
1	"	"	"	"	
2	2	2	$f_{2,5,2}$	$f_{2,5,2}$	
3	"	"	"	"	
4	4	4	$f_{4,7,4}$	$f_{4,7,4}$	
5	7	7	$f_{5,8,5}$	$f_{5,8,5}$	
6	"	"	"	"	
7	"	"	"	"	
8	"	10	"	$f_{9,8,4}$	

Für $(i, j) = (8, 9)$ wird ein neues Fragment mit höchstem Präfixgewicht gefunden. Das zuvor gespeichert Fragment $\begin{pmatrix} ADGTC \\ ADCTC \end{pmatrix}$ mit Gewicht 7 und ohne Vorgänger wird somit durch das Fragment $\begin{pmatrix} CTCA \\ CTCA \end{pmatrix}$ mit Vorgänger $\begin{pmatrix} GT \\ GT \end{pmatrix}$ ersetzt.

$f_0 = f_{\max} = Pr[8, 9] = f_{9,8,4}$, $f_1 = P(f_0) = f_{4,2,2}$ und zuletzt $f_2 = P(f_1) = \text{NIL}$. Das paarweise Alignment zwischen ADGTCTCA und GTCADCTCA sieht also wie folgt aus:

adGT---CTCA
--GTcadCTCA

Hierbei wurden alignierte Stellen großgeschrieben und als Zuweisungsspalten genau übereinander gereiht. Der Score des Alignments beträgt 10, weil es zunächst ein kurzes Fragment mit zwei Übereinstimmungen gibt (Gewicht: $2 \cdot 3 + 0 \cdot (-1) - 4 = 2$) und dann ein längeres mit vier Übereinstimmungen (Gewicht: $4 \cdot 3 + 0 \cdot (-1) - 4 = 8$). Dies sind die Ergebnisse aller paarweisen Alignments:

Sequenzen	Alignments	Score	Sequenzen	Alignments	Score
1 3	adgTCTCA--- ---TATCAdgg	10	1 4	aDGTC---TCa -DGTCadaTC-	7
2 3	-gTCADctca taTCADgg--	8	2 4	-GTCADCTCa dGTCADATC-	16
3 4	taTCADgg- dgTCADatc	8	1 2	adGT---CTCA --GTcadCTCA	10

3.4. Überlappgewichte

Beim multiplen Sequenzalignment werden normalerweise DNA- oder Proteinsequenzen miteinander verglichen, bei denen man davon ausgeht, dass sie einen gemeinsamen evolutionären Ursprung haben. Gibt es diesen, dann sind fast ausnahmslos auch gemeinsame Motive erhalten geblieben, die in vielen oder sogar allen Sequenzen vorkommen. Für ein biologisch korrektes Alignment ist es notwendig, diese zu finden und über möglichst viele Sequenzen hinweg einander zuzuweisen. Wurden diese verwandten Abschnitte bereits gefunden und miteinander aligniert, werden in der Regel auch die Zuweisungen zwischen diesen sogenannten Ankerpunkten besser [MPDS06].

Es ist jedoch nicht immer leicht diese Motive zu finden, weil sie im Vergleich zu zufälligen Übereinstimmungen klein sein können. In dem Fall bekommen sie nur geringe Gewichte durch unsere Gewichtsfunktion und wenn wir am Ende von DIALIGN durch gieriges Auswählen der Fragmente das multiple Alignment bestimmen, kann es sein, dass sie nicht berücksichtigt werden, weil andere höher gewichtete Zuweisungen zu ihnen inkonsistent sind. Gierig bedeutet in diesem Fall, dass einmal gewählte Fragmente nicht mehr aus diesem entfernt werden können.

Um dieses Problem zu verhindern und Motive zu bevorzugen, die in möglichst vielen Sequenzen vorkommen, führen wir das Konzept der sogenannten *Überlappgewichte* ein [MDW96]. Betrachten wir dazu drei verschiedene Sequenzen S_1 , S_2 und S_3 und zwei Fragmente $f^{1,2}$ und $f^{2,3}$ zwischen diesen. Es mag sein, dass die beiden Fragmente eine Überlappung in S_2 haben. In diesem Fall ist an dem Alignment ein drittes implizites Fragment $f^{1,3}$ zwischen S_1 und S_3 beteiligt, das auf ein gemeinsames Motiv zwischen allen drei Sequenzen hindeutet. Daher ist es angemessen die ursprünglichen Fragmente stärker zu gewichten, indem wir zu ihnen das Gewicht der Überlappung addieren.

$$\tilde{w}(f^{1,2}, f^{2,3}) := w(f^{1,3}) \quad (3.14)$$

Das Überlappgewicht eines Fragments mit sich selbst und zwischen zwei Fragmenten, die sich nicht überschneiden, definieren wir als 0.

Analog definieren wir das Überlappgewicht eines einzelnen Fragments als sein Gewicht addiert mit der Summe aller Überlappgewichte zwischen sich selbst und allen anderen Fragmenten:

$$\hat{w}(f) := w^*(f) + \sum_{e \in F} \tilde{w}(f, e) \quad (3.15)$$

Benutzt man Überlappgewichte, muss jedoch die Zusammensetzung der Sequenzen stärker beachtet werden. Liegt nämlich eine große Subfamilie von sehr ähnlichen Sequenzen vor, dann werden alle Fragmente zwischen einer Sequenz innerhalb und einer Sequenz außerhalb dieser Familie durch hohe Überlappgewichte gegenüber denen bevorzugt, die zwischen zwei Sequenzen berechnet wurden, die nicht aus der Sequenzfamilie stammen. [VS93] stellen Methoden vor, die solchen Problemen vorbeugen.

3.4.1. Verbesserte Berechnung und Laufzeit

Das Berechnen der Überlappgewichte geschieht bei DIALIGN durch einen naiven Vergleich aller Fragmente der paarweisen Alignments miteinander, bei dem sie auf Überschneidun-

3. Das DIALIGN-Verfahren

gen untersucht werden. Da es in den $O(n^2)$ Alignments zwischen n Sequenzen jeweils bis zu $O(L)$ Fragmente gibt, kommt man so auf eine Gesamtlaufzeit von $O(n^4 \cdot L^2)$ [Mor99].

Bei einer genaueren Betrachtung des Problems hat sich herausgestellt, dass für ein Fragment $f^{k,l}$ gar nicht alle Fragmente auf Überlappungen überprüft werden müssen, sondern nur die, an denen eine der beiden Sequenzen S_k oder S_l unseres Fragments beteiligt ist. Außerdem müssen wir nicht jedes Fragment eines anderen paarweisen Alignments betrachten, sondern können in sortierten Fragmentketten durch die Start- und Endpunkte sehr genau abschätzen, welche für Überlappungen in Frage kommen. Dazu benutzen wir den folgenden Satz:

3.4.1 Satz

Für eine Menge S von n Sequenzen und eine Menge F von paarweisen Fragmenten zwischen diesen Sequenzen lassen sich in $O(n^3 \cdot L)$ Zeit die Überlappgewichte berechnen.

Beweis. Zwischen den n Sequenzen gibt es $\binom{n}{2} \in O(n^2)$ paarweise Alignments. Wir können o.B.d.A annehmen, dass diese in einer Tabelle A vorliegen, wobei $A_{i,j}$ die Fragmente des paarweisen Alignments zwischen S_i und S_j in einer sortierten Liste enthält. Das liegt daran, dass der soeben gesehen Algorithmus 3 die Fragmente mit seinem Backtrackingprozess sortiert ausgibt.

Betrachten wir ein Alignment zwischen den Sequenzen S_i und S_k . Dann müssen wir für die Überlappgewichte nur die Einträge $A_{i,k}$ und $A_{l,j}$ mit $1 \leq k, l \leq n$ betrachten, denn es sind nur die Alignments relevant, bei denen eine der Sequenzen übereinstimmt. In einer vollständigen Tabelle sind das alle Listen, die in der selben Spalte oder Zeile stehen, also $O(n)$ viele.

Seien $A_{i,k}$ und $A_{k,j}$ zwei Alignments, von denen wir die Überlappgewichte berechnen wollen. Dazu müssen wir die Überlappung zwischen allen Fragmenten in S_k bestimmen. Dies können wir in linearer Zeit machen, indem wir parallel über die beiden sortierten Listen traversieren und anhand der Start- und Endpunkte in S_k die impliziten Fragmente zwischen S_i und S_j bestimmen sowie die Gewichte der Fragmente aktualisieren. Dafür benötigen wir nur $O(L)$ Zeit, weil wir einmalig jedes Element der beiden Listen betrachten, es bis zu $O(L)$ Fragmente pro Alignment gibt und jedes von diesen in der Länge durch $l_{\max} \in O(1)$ beschränkt ist. Insgesamt haben wir also $O(n^2)$ paarweise Alignments für die mit jeweils $O(n)$ anderen Alignments Überlappgewichte berechnet werden müssen, was jeweils $O(L)$ Zeit kostet. Es folgt die Gesamtlaufzeit von $O(n^3 \cdot L)$. \square

2	$A_{2,1}$			
3	$A_{3,1}$	$A_{3,2}$		
\vdots	\vdots	\vdots	\ddots	
n	$A_{n,1}$	$A_{n,2}$	\dots	$A_{n,n-1}$
i \ j	1	2	\dots	n-1

Tabelle 3.1.:

Jeder Tabelleneintrag $A_{i,j}$ enthält Liste von Fragmenten.

Genau genommen brauchen wir keine quadratische Tabelle, weil der Eintrag $A_{i,j}$ aus Symmetriegründen identisch zu $A_{j,i}$ ist. Auch die Diagonale können wir uns sparen, denn das Alignieren einer Sequenz mit sich selbst ist unnötig. Des Weiteren kann beim Algorithmus aus dem Beweis von Satz 3.4.1 die Hälfte des Aufwands eingespart werden, denn die Überlappgewicht zwischen $A_{i,k}$ und $A_{k,j}$ müssen nicht doppelt berechnet werden, sondern können gleich zu den Gewichten in beiden Alignments addiert werden. Obgleich

das nichts an der asymptotischen Laufzeit ändert, macht es in der Praxis einen Unterschied.

3.4.2. Beispiel Überlappgewichte

Widmen wir uns der Berechnung von Überlappgewichten nach Satz 3.4.1 in unserem Beispiel und betrachten dazu das Alignment zwischen den Sequenzen S_1 und S_3 . Um das Gewicht zu aktualisieren, müssen wir alle Alignments auf Überlappungen überprüfen, in denen eine der beiden Sequenzen vorkommt.

2	$A_{2,1}$		
3	$A_{3,1}$	$A_{3,2}$	
4	$A_{4,1}$	$A_{4,2}$	$A_{4,3}$
i \ j	1	2	3

Tabelle 3.2.:

Auf Überlappungen zu überprüfende Alignments

Da unsere Tabelle 3.2 nicht vollständig ist, reicht es nicht, die Einträge derselben Spalte und Zeile zu überprüfen, weil diese unter Umständen nicht vollständig ist. Stattdessen müssen wir alle Einträge in der ersten und dritten Spalte oder Zeile betrachten. Dann gehen wir alle Fragmente der Reihe nach durch und entscheiden anhand der Start- und Endpunkte in der gemeinsamen Sequenz, ob es Überschneidungen gibt. Falls ja, bestimmen wir diese und addieren das Gewicht zu dem unseres Fragments. Rufen wir uns den bisherigen Stand der Scores der paarweisen Alignments in Erinnerung:

Sequenzen	Alignments	Score	Sequenzen	Alignments	Score
1 3	adgTCTCA--- ---TATCAdgg	10	1 4	aDGTC---TCa -DGTCadaTC-	7
2 3	-gTCADctca taTCADgg--	8	2 4	-GTCADCTCa dGTCADATC-	16
3 4	taTCADgg- dgTCADatc	8	1 2	adGT---CTCA --GTcadCTCA	10

Wie wir sehen, enthält das von uns betrachtete Alignment nur das eine Fragment $f_{8,5,5}$ mit drei Übereinstimmungen und einer Abweichung. Als erstes überprüfen wir die Überlappung mit $A_{2,1}$. Beide haben den gemeinsamen Abschnitt CTCA in S_1 , woraus sich das neue Fragment $\binom{CTCA}{ATCA}$ zwischen S_2 und S_3 ergibt. Dieses hat drei Übereinstimmungen, eine Abweichung und somit ein Gewicht von 8. In der Folge addieren wir diese Zahl zum Gewicht von $f_{8,5,5}^{1,3}$ und zu dem von $f_{8,9,4}^{1,2}$. Wenn wir diese Berechnungen auch mit und zwischen allen anderen Alignments durchführen, kommen wir zu den folgenden Überlappgewichten:

Seq.	Frag.	Ü-Gew.	Seq.	Frag.	Ü-Gew.	Seq.	Frag.	Ü-Gew.
2	GTCADCTC	69	1	TCTCA	41	1	GT	20
4	GTCADATC		3	TATCA		2	GT	
3	TCAD		1	CTCA	34	1	TC	20
4	TCAD	47	2	CTCA		4	TC	
2	TCAD	44	1	DGTC	31			
3	TCAD		4	DGTC				

Da wir im nächsten Schritt die Fragmente für unser multiples Alignment basierend auf ihren Gewichten gierig auswählen, wurden die Abschnitte bereits sortiert. Ein Algorithmus wird als gierig bezeichnet, wenn er eine Entscheidung lokal optimal trifft und danach nicht wieder ändert. In unserem Fall bedeutet das, dass die Fragmente mit höheren Gewichten

3. Das DIALIGN-Verfahren

früher gewählt werden und selbst dann nicht wieder aus unserem multiplen Alignment entfernt werden, wenn sie durch Inkonsistenzen verhindern, dass andere, zusammen möglicherweise bessere Fragmente gewählt werden können. Durch diese radikale Vorgehensweise haben gierige Algorithmen oft gute Laufzeiten, liefern aber nicht immer die bestmöglichen Ergebnisse.

3.5. Konsistenz

Die nach ihrem Gewicht sortierten Fragmente möchten wir der Reihe nach in unser multiples Alignment einfügen, vorausgesetzt, das gerade gewählte ist nicht inkonsistent zu den zuvor integrierten. Wenn wir uns an den Abschnitt über die theoretischen Grundlagen 3.1 erinnern, dann hatten wir formal definiert, dass eine Relation \mathcal{R} genau dann ein Alignment ist, wenn $\leq_{\mathcal{R}} = (\leq \cup \mathcal{R})_t$ die natürliche Ordnung auf jeder Sequenz erhält, also $x \leq_{\mathcal{R}} y \implies x \leq y$ für alle $x, y \in S_i \forall 1 \leq i \leq n$ gilt.

Mengentheoretisch können wir uns unser Vorgehen so vorstellen, dass wir eine Menge von Fragmenten f_1, \dots, f_k haben, die wir der Reihe nach in unser wachsendes multiples Alignment hinzufügen wollen, vorausgesetzt sie sind konsistent zueinander. Die hinzugefügten Fragmente bilden dabei für $i = 2, \dots, k$ eine aufsteigende Kette von Mengen $A_1 \subset \dots \subset A_k$:

$$\begin{aligned} \mathcal{A}_1 &= f_1 \\ \mathcal{A}_i &= \begin{cases} (\mathcal{A}_{i-1} \cup f_i), & \text{falls } f_i \text{ konsistent ist zu } A_{i-1} \\ A_{i-1}, & \text{sonst} \end{cases} \end{aligned} \quad (3.16)$$

Das finale Alignment \mathcal{A} ist dann genau das resultierende größte Alignment \mathcal{A}_k . Ziel ist es jetzt eine Möglichkeit zu finden, möglichst effizient zu bestimmen, ob ein Fragment konsistent zum bisherigen Alignment ist. Wir führen dazu zunächst folgende Definition ein:

3.5.1 Definition (Konsistenzgrenze[AM00])

Gegeben seien ein Alignment \mathcal{A} auf einer Menge von Sequenzen S mit Stellenraum S . Dann existieren für eine Stelle $s \in S$ und eine Sequenz $S_i \in S$ eine kleinste und größte Stelle in S_i , die mit s alignierbar ist, ohne zu Inkonsistenzen zu führen.

$$\begin{aligned} \underline{b}_{\mathcal{A}}(s, i) &= \min(p : (s, [i, p]) \text{ ist konsistent zu } \mathcal{A}) \\ \overline{b}_{\mathcal{A}}(s, i) &= \max(p : (s, [i, p]) \text{ ist konsistent zu } \mathcal{A}) \end{aligned} \quad (3.17)$$

Diese beiden Stellen nennen wir die *Konsistenzgrenzen* von s in S_i .

In der ersten Version von DIALIGN wurden diese Konsistenzgrenzen für alle Stellen gespeichert und jedes Mal aktualisiert, wenn eine neue Sequenz zum multiplen Alignment hinzugefügt wurde [MDW96]. Das verursachte Speicherplatzbedarf in der Größenordnung $\Theta(n^2 \cdot L)$, denn für jede Stelle aus jeder Sequenz ($\Theta(n \cdot L)$ viele) mussten die Konsistenzgrenzen für jede der n Sequenzen gespeichert werden. Noch schlechter ist die Laufzeit bei diesem naiven Ansatz, denn im schlimmsten Fall gibt es $O(n^2 \cdot L)$ Fragmente, die der

Reihe nach zum Alignment hinzugefügt werden, für die jeweils alle $\theta(n \cdot L)$ Konsistenzgrenzen überprüft und gegebenenfalls angepasst werden müssen. Es folgt eine Laufzeit von $O(n^4 \cdot L^2)$, die auch die Gesamtlauzeit des DIALIGN-Verfahrens dominiert hat [Mor99].

Weil die Laufzeit im Vergleich zu anderen Alignmentverfahren, wie beispielsweise Clustal W, sehr schlecht war, entschied man sich den von [Abd97] veröffentlichten und in der GABIOS-LIB (Greedy Alignment of BIOlogical Sequences LIBrary) implementierten besseren Ansatz auch in DIALIGN einzubauen. Wie wir im Folgenden sehen werden, ist es möglich das Problem der Konsistenzgrenzen durch den Erhalt der transitiven Hülle eines Graphen abzubilden. Dadurch kann man die Fragmente deutlich effizienter der Reihe nach in unser multiples Alignment einfügen, wodurch sich die praktische Laufzeit in etwa um den Faktor zehn verbessern lässt [AM00].

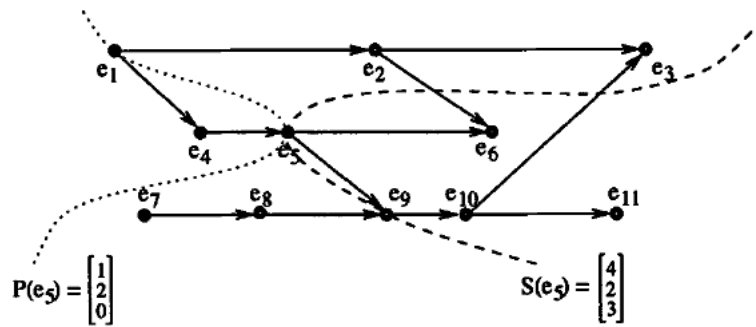


Abbildung 3.3.: Die Transitivitätsgrenzen des Knotens e_5 in einem Graphen mit SSDP bei dem jede Zeile einem der Pfade entspricht [Abd97].

3.5.2 Definition (Transitivitätsgrenzen [AM00])

Die sogenannten *Transitivitätsgrenzen* erlauben es uns die Konsistenzgrenzen als graphtheoretisches Problem zu verstehen. Wir definieren zu unserer Stelle s die *Vorgängergrenze* $\text{Pred}_{\mathcal{A}}(s, i)$ als die Stelle y aus der Sequenz S_i , die von allen Stellen mit $y \leq_{\mathcal{A}} s$ am weitesten rechts steht. Analog wird die *Nachfolgergrenze* $\text{Succ}_{\mathcal{A}}(s, i)$ als am weitesten links stehende Stelle mit $s \leq_{\mathcal{A}} y$ festgelegt.

$$\begin{aligned} \text{Pred}_{\mathcal{A}}(s, i) &= \max(p : [i, p] \leq_{\mathcal{A}} s) \\ \text{Succ}_{\mathcal{A}}(s, i) &= \min(p : s \leq_{\mathcal{A}} [i, p]) \end{aligned} \quad (3.18)$$

Abbildung 3.3 zeigt ein Beispiel für die Transitivitätsgrenzen eines Knotens in einem Graphen. Wie man sieht, entsprechen diese genau der Position des Knotens in dem Pfad zu dem er selbst gehört. Für den dritten Pfad zeigt die Vorgängergrenze tatsächlich vor das erste Element, weil es kein Element $[3, p]$ mit $[3, p] \leq_{\mathcal{A}} e_5$ gibt. Zwischen Transitivitäts- und Konsistenzgrenzen herrscht ein direkter Zusammenhang. Ist eine Stelle $s \in S$ bereits mit einer anderen Stelle aus der Sequenz $S_i \in S$ aligniert, dann gibt es zwischen allen vier Grenzen keinen Unterschied und es gilt:

$$\text{Pred}_{\mathcal{A}}(s, i) = \text{Succ}_{\mathcal{A}}(s, i) = \underline{b}_{\mathcal{A}}(s, i) = \bar{b}_{\mathcal{A}}(s, i) = p \quad (3.19)$$

Gibt es hingegen keine Stelle in S_i , die bereits s zugewiesen wurde, dann unterscheiden

3. Das DIALIGN-Verfahren

sich $\text{Pred}_{\mathcal{A}}(s, i)$ und $\underline{b}_{\mathcal{A}}(s, i)$, sowie $\text{Succ}_{\mathcal{A}}(s, i)$ und $\bar{b}_{\mathcal{A}}(s, i)$ jeweils nur um genau eine Position.

$$\begin{aligned}\text{Pred}_{\mathcal{A}}(s, i) &= \underline{b}_{\mathcal{A}}(s, i) - 1 \\ \text{Succ}_{\mathcal{A}}(s, i) &= \bar{b}_{\mathcal{A}}(s, i) + 1\end{aligned}\tag{3.20}$$

Man kann also sagen, dass Transitivitätsgrenzen und Konsistenzgrenzen äquivalent sind, denn wenn das aktuelle Alignment bekannt ist, kann mit dem einen das jeweils andere bestimmt werden. Daraus folgt auch, dass man mit beiden darstellen kann, ob zwei Stellen miteinander alignierbar sind oder nicht. In den nächsten beiden Abschnitten wird eine Technik vorgestellt,

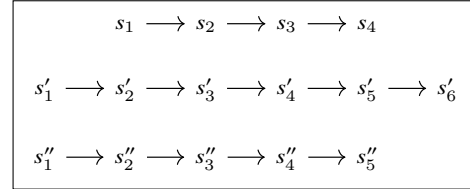


Abbildung 3.4.: SSDP über drei Sequenzen.

mit der man in konstanter Zeit entscheiden kann, ob zwei Stellen miteinander alignierbar sind, sowie einen inkrementellen Algorithmus, der es uns in angemessener Zeit erlaubt, ein Alignment zwischen zwei Stellen in unser multiples Alignment hinzuzufügen. Das wird erreicht, indem wir unseren Stellenraum \mathcal{S} als gerichteten Graph auffassen, in dem die einzelnen Stellen Knoten entsprechen und jede Sequenz einen Pfad durch den Graphen darstellt. Jedes Mal, wenn eine Zuweisung zwischen zwei Stellen ausgewählt wird, fügen wir eine neue Kante zu unserem Graphen hinzu. Ziel ist es in jedem Schritt unseres Verfahrens die transitive Hülle des Graphen zu kennen, denn mit ihr lässt sich entscheiden, ob das Fragment, das wir gerade wählen wollen, konsistent zum bisherigen Alignment ist oder nicht. Als erstes wird der Algorithmus auf allgemeinen Graphen vorgestellt, bevor wir zeigen, wie ihn im Kontext des Multiple-Sequence-Alignment-Problems anwenden können.

3.5.1. Berechnung der transitiven Hülle eines gerichteten Graphen

Sei $G = (V, E)$ ein gerichteter Graph mit einer Menge Knoten V und einer Menge an Kanten E zwischen diesen Knoten. Unter einem Pfad P auf G verstehen wir ein k -Tupel von Knoten (v_1, \dots, v_k) , sodass $(v_i, v_{i+1}) \in E$ für alle $1 \leq i \leq k - 1$, also eine Folge von Knoten, die alle direkt durch Kanten miteinander verbunden sind. Dabei nennen wir den Index eines Knotens innerhalb dieses Tupels seine Position ($\text{pos}(x)$ für $x \in P$).

Die transitive Hülle eines Graphen $G = (V, E)$ ist der Graph $G^* = (V, E^*)$, in dem es eine Kante $(u, v) \in E^*$ gibt, falls es in G einen Pfad von u nach v gibt. Für jedes $(u, v) \in E^*$ heißt u *Vorgänger* von v und v *Nachfolger* von u . Diese Vorgänger und Nachfolger sind nicht mit den gleichnamigen Definitionen aus dem Abschnitt 3.3.1 über die paarweisen Alignments zu verwechseln. Zunächst definieren wir einige Variablen für den Kontext dieses Abschnitts: die Anzahl der Knoten $|V| = \nu$, die der Kanten $|E| = \mu$, die der Kanten in der transitiven Hülle $|E^*| = \mu^*$ und die Anzahl Kanten μ_0 , die sich vor dem Hinzufügen von neuen Verbindungen in unserem Graphen befinden. Zuletzt benötigen wir noch μ_p für die Anzahl der Kanten über die ein Pfad P traversiert.

3.5.3 Definition (Spanning Set of Disjoint Paths (SSDP) [Abd97])

Sei im Folgenden eine $\mathcal{P} = \{P_1, \dots, P_k\}$ von Pfaden auf einem Graphen $G = (V, E)$ gegeben, für die gilt, dass jeder Knoten aus V in genau einem der Pfade vorkommt. Eine solche Menge nennen wir SSDP (*Spanning Set of Disjoint Paths*), also eine Menge von disjunkten Pfaden, die den ganzen Graphen aufspannen.

In dem Kontext des Multiple-Sequence-Alignment-Problems lässt sich ein solches SSDP leicht konstruieren, indem für jede Sequenz ein Pfad konstruiert wird, bei dem jedes Symbol mit dem direkten Nachfolger der gleichen Sequenz über eine Kante verbunden ist. Ein Beispiel für drei Sequenzen ist in Abbildung 3.4 zu sehen.

3.5.4 Satz ([Abd97])

Es sei ein SSDP mit k disjunkten Pfaden gegeben. Dann lässt sich die transitive Hülle G^* unseres Graphen in $O(k^2 \cdot (\mu - \mu_0) + \nu \cdot \min\{\nu, (\mu - \mu_p)\})$ Zeit und mit $O(k \cdot \nu)$ Speicherplatz erhalten, nachdem Kanten zu ihm hinzugefügt wurden.

Bevor wir diesen Satz beweisen können, brauchen wir einige Vorüberlegungen. Für einen Knoten x sei $P(x)$ das Tupel, das in jedem Eintrag $P(x)[i]$ für $1 \leq i \leq k$ die Anzahl an Vorgängern von x im Pfad P_i angibt. In anderen Worten ist $P(x)[i]$ die maximale Position eines Vorgängers in P_i . Analog definieren wir $S(x)$, wobei $S(x)[i]$ der minimale Nachfolger von x in S_i ist. In Abschnitt 3.5.2 werden wir zeigen, dass $S(x)$ und $P(x)$ genau den Transitivitätsgrenzen aus dem Kontext von Alignments entsprechen und wir verwenden diese Begriffe synonym. Gibt es keine Vorgänger oder Nachfolger, setzen wir diese Werte auf 0 beziehungsweise auf $|P_i| + 1$ im Fall des Pfades P_i . Für Elemente x und y auf zwei Pfaden P_i und P_j kann man sich leicht überlegen, dass aus $\text{pos}(x) \leq P(y)[i]$ folgt, dass $(x, y) \in E^*$ gilt. Die gleiche Aussage folgt aus $\text{pos}(y) \geq S(x)[j]$. Wie man sieht, ist es also möglich die transitive Hülle auf $O(k \cdot \nu)$ Speicherplatz zu sichern, wenn ein SSDP mit k Pfaden vorliegt. Das kann signifikant weniger sein als die $O(\nu^2)$ Kanten, die im naiven Ansatz gespeichert werden müssen.

Als nächstes führen wir eine Funktion `EdgeAddition` ein, die die Transitivitätsgrenzen nach dem Hinzufügen einer einzelnen Kante aktualisiert. Wollen wir unseren Graphen um mehr als eine Kante ergänzen, fügen wir sie der Reihe nach hinzu und rufen sukzessive die Funktion auf. Das ist beispielsweise der Fall, wenn wir ein längeres Fragment zu unserem Alignment hinzufügen. Im Folgenden seien die transitive Hülle

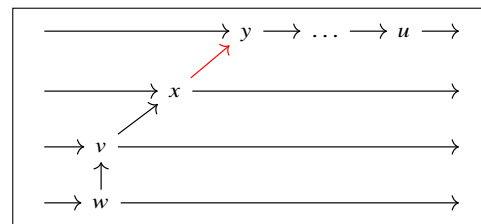


Abbildung 3.5.: Füge (x, y) ein.

und die Transitivitätsgrenzen unseres ursprünglichen Graphen gegeben. Sei außerdem (x, y) die Kante, die wir ergänzen. Nun wählen wir einen beliebigen Knoten $u \in V$, dessen Transitivitätsgrenzen wir aktualisieren. $P(u)$ und $S(u)$ bezeichnen dabei die Grenzen vor und $P'(u)$ und $S'(u)$ die Grenzen nach dem Hinzufügen. Als erstes kann man sich überlegen, dass die Vorgängergrenzen ausschließlich wachsen können, während die Nachfolgergrenzen höchstens kleiner werden. Des Weiteren kann sich durch eine Kante von x nach y nur die Vorgängergrenzen von u in einer Sequenz verändern, wenn u ein Nachfolger von y war und die Nachfolgergrenze, wenn u ein Vorgänger von x war. Im ersten Fall wählt wird das Maximum der beiden möglichen Werte ausgewählt und im letzteren das Minimum.

3. Das DIALIGN-Verfahren

Mit diesen zwei Formeln können wir für ein $u \in P_i$ und jeden Pfad P_j die neuen Transitivitätsgrenzen von u bestimmen:

$$P'(u)[j] = \begin{cases} \max\{P(u)[j], P(x)[j]\}, & \text{falls } u \text{ Nachfolger von } y \text{ war} \\ P(u)[j], & \text{sonst} \end{cases} \quad (3.21)$$

$$S'(u)[j] = \begin{cases} \min\{S(u)[j], S(y)[j]\}, & \text{falls } u \text{ Vorgänger von } x \text{ war} \\ S(u)[j], & \text{sonst} \end{cases} \quad (3.22)$$

Falls bereits ein Pfad zwischen x und y existiert, wissen wir, dass sich die transitive Hülle nicht verändert und dass wir die Transitivitätsgrenzen dementsprechend nicht anpassen müssen. Die obigen Beobachtungen können wir jetzt direkt in den Algorithmus 4 EdgeAddition münden lassen, indem wir über alle Paarkombinationen von Pfaden iterieren und dabei für jeden in Frage kommenden Knoten im jeweiligen Pfad die obigen Formeln anwenden. Wir wählen dabei die Knoten für die Nachfolgergrenze in absteigender und die für die Vorgängergrenze in aufsteigender Reihenfolge. Weil wir wissen, dass die Nachfolgergrenze immer nur sinken kann und wir die in Frage kommenden Knoten sortiert betrachten, folgt, dass der aktuelle Schleifendurchlauf abgebrochen werden kann, wenn die Nachfolgergrenze kleiner oder genauso groß ist wie die von y . In diesem Fall würde sie nicht mehr aktualisiert werden und wir können uns die Berechnung sparen. Für die Vorgängergrenzen gehen wir analog vor. Jetzt haben wir in der Lage Satz 3.5.4 zu beweisen.

Algorithmus 4 Algorithmus EdgeAddition, der die transitive Hülle eines Graphen mit SSDP nach dem Hinzufügen einer Kante aktualisiert.

Require: Gerichteter Graph G mit SSDP P_1, \dots, P_k

```

1: procedure EDGEADDITION( $x, y$ )
2:   if  $(x, y) \notin E^*$  then
3:     for each Pfad  $P_i$  do
4:       for each Pfad  $P_j$  do
5:         for each  $u$  in  $P_i$  startend von  $P(x)[i]$  in absteigender Reihenfolge do
6:           if  $S(u)[j] > S(y)[j]$  then
7:              $S(u)[j] \leftarrow S(y)[j]$  ▷ aktualisiere Nachfolgergrenze
8:           else
9:             breche den aktuellen Schleifendurchlauf für  $u$  ab
10:          end if
11:        for each Pfad  $P_i$  do
12:          for each Pfad  $P_j$  do
13:            for each  $u$  in  $P_i$  startend von  $S(y)[i]$  in aufsteigender Reihenfolge do
14:              if  $P(u)[j] < P(x)[j]$  then
15:                 $P(u)[j] \leftarrow P(x)[j]$  ▷ aktualisiere Vorgängergrenze
16:              else
17:                breche den aktuellen Schleifendurchlauf für  $u$  ab
18:              end if
19:            end if
20:          end procedure
```

Beweis. Im schlimmsten Fall werden die ineinander verschachtelten Schleifen je $O(k^2 \cdot (\mu - \mu_0))$ -mal durchlaufen. Das ergibt sich aus der Kombination aller $O(k^2)$ Paare von Pfaden

und, dass nur für die ursprünglichen Kanten μ_0 im Graphen und die sie verbindenden Knoten die if-Bedingungen in Zeile 6 und 14 nicht erfüllt sein könnten.

Bei genauerer Betrachtung wie oft es wirklich zu einer Aktualisierung der Transitivitätsgrenzen kommen kann, stellen wir fest, dass diese je nach Graph möglicherweise viel geringer ist als oben abgeschätzt. Um Redundanz zu vermeiden, betrachten wir hier nur die Vorgängergrenzen. Für Nachfolgergrenzen gilt aus Symmetriegründen genau das selbe. Die einzige Situation, in der ein Knoten $v \in V$ die Vorgängergrenzen eines anderen Knotens u verändern kann, ist, wenn v ein Vorgänger von x , aber kein Vorgänger von u ist, bevor die Kante (x, y) hinzugefügt wird (vgl. beispielsweise Abbildung 3.5). Gleichzeitig muss u ein Nachfolger von y sein, da die Pfade \mathcal{P} disjunkt sind. Also folgt, dass die Vorgängergrenzen von u höchstens v -mal angepasst werden und es insgesamt nicht mehr als v^2 Anpassungen gibt.

Sei (w, v) eine Kante unseres Graphen, die auf keinem unserer Pfade aus dem SSDP liegt. Diese Kante kann die Vorgängergrenze von u in der Methode `EdgeAddition` nur dann verändern, wenn v ein Vorgänger von x ist, aber kein Vorgänger von u , bevor die Kante (x, y) hinzugefügt wird. Nach dieser Aktualisierung kann die Kante (w, v) die Transitivitätsgrenzen von u nie wieder anpassen. Das bedeutet, dass dies für einen Knoten u höchstens so oft passiert, wie es Kanten gibt, die in keinem Pfad des SSDP liegen. Das sind genau $O(\mu - \mu_p)$ und es folgt, dass insgesamt höchstens $v \cdot (\mu - \mu_p)$ solcher Aktualisierungen vorgenommen werden.

Da sowohl die Anzahl dieser Knoten, als auch der Kanten im Graph die Anzahl der Aktualisierungen beschränken, kann es nicht zu mehr Aktualisierungen als dem Minimum dieser beiden Werte kommen, also $O(v \cdot \min\{v, \mu - \mu_p\})$. Fasst man alles zusammen, so folgt die behauptete Laufzeit von $O(k^2 \cdot (\mu - \mu_0) + v \cdot \min\{v, \mu - \mu_p\})$. \square

3.5.2. Konsistenzgrenzen durch Berechnung der transitiven Hülle

Jetzt möchten wir den allgemeinen graphtheoretischen Ansatz auf unser multiples Alignment anwenden. Zunächst übertragen wir unsere Sequenzen $S = \{S_1, \dots, S_n\}$ auf einen Graphen $G = (V, E)$ mit SSDP. Hierbei ist jede Stelle aus S ein Knoten. Zwischen zwei Knoten u und v gibt es genau dann eine Kante $(u, v) \in E$, wenn die dazugehörigen Stellen aus der selben Sequenz kommen und direkt aufeinanderfolgen. Dadurch ergibt sich automatisch unser SSDP mit n Pfaden, denn jede Sequenz liefert genau einen solchen und da jeder Knoten mit genau einer Sequenz assoziiert ist, spannen diese Pfade auch den ganzen Graphen. Den Pfad einer Sequenz S_i bezeichnen wir als P_i . Jedes Mal, wenn wir in unserem Alignment von S zwei Stellen (i, p) und (j, q) miteinander alignieren, fügen wir je eine Kante in beide Richtungen zwischen den dazugehörigen Knoten im Graphen ein.

3.5.5 Definition (Alignmentgraph[Abd97])

Den soeben definierten Graphen bezeichnen wir als *Alignmentgraphen*.

Gibt es zwischen u und v Pfade in beiden Richtungen $((u, v)$ und $(v, u) \in E^*$), dann symmetrisieren wir dies durch $u \rightleftharpoons^* v$. Wir sagen dann, dass u und v miteinander *koinzidieren*.

Wie bereits angedeutet ist es bei einem Alignment möglich Lücken so in die Sequenzen einzufügen, dass genau die einander zugewiesenen Symbole übereinander stehen. Diese Tupel von Stellen nennen wir *Zuweisungsspalten* und zu ihnen zählen wir nur die miteinander alignierten Symbole. Andere, nicht mit den gerade betrachteten Stellen alignierte Symbole, gehören nicht zur Zuweisungsspalte, selbst wenn sie in der selben Spalte der

3. Das DIALIGN-Verfahren

Sequenzen stehen, nachdem man Lücken eingefügt hat. Eine Menge von miteinander koinzidierenden Knoten nennen wir einen *Anker*, wenn es keine weiteren Knoten gibt, die mit Knoten aus dieser Menge koinzidieren.

3.5.6 Definition (Regularität[Abd97])

Wir nennen einen Alignmentgraphen mit seinem SSDP (G, P) auf einer Menge von Sequenzen S genau dann *regulär*, wenn die zugrundeliegende Relation ein Alignment ist.

3.5.7 Lemma ([Abd97])

Sei G ein Alignmentgraph und P das ihm zugewiesene SSDP. (G, P) ist genau dann regulär, wenn jeder dazugehörige Anker höchstens einen Knoten aus jedem Pfad von P hat. In diesem Fall entspricht ein Anker genau einer Zuweisungsspalte.

Beweis. „ \Rightarrow “: Angenommen, jeder Anker unseres Alignmentgraphen G enthält höchstens einen Knoten aus jedem Pfad in P . Betrachten wir jetzt die Halbordnung \leq^* , bei der für zwei Anker a und b $a \leq^* b$ genau dann gilt, wenn zwischen zwei Knoten $u \in a$ und $v \in b$ ein Pfad in G existiert. Da keiner der Anker von G zwei oder mehr verschiedene Knoten vom selben Pfad aus P enthält und da auf ihnen unsere Halbordnung \leq^* existiert, können wir anhand dieser die Anker immer in Zuweisungsspalten übereinander schreiben und erhalten somit ein Alignment. \leq^* entspricht dabei genau der topologischen Sortierung auf G . Da auf (G, P) ein Alignment existiert, ist es regulär.

„ \Leftarrow “: Sei G regulär. Dann ist die zugehörige Relation zwischen Knoten per Definition ein Alignment und für dieses können wir die Zuweisungen in Zuweisungsspalten untereinander schreiben. Somit sind alle Anker Zuweisungsspalten und keiner enthält zwei oder mehr Knoten aus derselben Sequenz. \square

Für den Rest des Abschnitts nehmen wir an, dass unser Alignmentgraph G mit SSDP regulär ist. Ziel ist es jetzt zu überprüfen, ob er auch regulär bleibt, nachdem eine Zuweisung zwischen zwei Stellen s und t und die korrespondierenden Kanten in G hinzugefügt wurde. Falls ja, dann nennen wir s und t *alignierbar*, einen Begriff, den wir zuvor bereits informell genutzt haben.

3.5.8 Lemma ([Abd97])

Zwei Stellen s und t mit den korrespondierenden Knoten u und v sind genau dann alignierbar, wenn eine der folgenden zwei Bedingungen eintritt:

- (1) Es existiert kein Pfad zwischen u und v , das heißt $(u, v), (v, u) \notin E^*$,
- (2) u und v koinzidieren miteinander, also $u \rightleftharpoons^* v$.

Beweis. Sei G' der Graph nach dem Hinzufügen der Kanten (u, v) und (v, u) . Wir müssen zeigen, dass (G', P) genau dann regulär ist, wenn eine der beiden obigen Bedingungen eintritt.

„ \Rightarrow “: (1) Angenommen, es existiert kein Pfad zwischen u und v und seien a_1 und a_2 die dazugehörigen Anker der beiden Knoten. Es sei $a = a_1 \cup a_2$ der neue Anker von G' nach dem Hinzufügen von (u, v) . Dann kann a nicht mehrere Knoten vom selben Pfad aus P enthalten, weil es sonst bereits einen Pfad von u nach v oder von v nach u gegeben hätte und die Vorbedingung verletzt gewesen wäre. Das liegt daran, dass es zwischen diesen

Knoten vom selben Pfad eine Kante gegeben haben müsste, über die dann auch eine einseitige Verbindung zwischen u und v bestünde. Weil alle anderen Anker von G nicht verändert werden, folgt, dass G' regulär ist.

(2) Es gelte $u \rightleftharpoons^* v$ für G . Dann sind die Anker von G' die selben wie von G , denn u und v haben bereits zuvor koinziiert. Also ist auch G' regulär, da G es war.

„ \Leftarrow “: Die Rückrichtung des Beweises führen wir per Kontrapositionsbeweis. Es sei also nur eine einseitige Verbindung zwischen u und v gegeben. O.B.d.A. nehmen wir an, dass $(u, v) \in E^*$ und $(v, u) \notin E^*$. Da G ein Alignmentgraph ist, gibt es zwangsläufig zwei Knoten x und y , die auf dem selben Pfad P_i aus \mathcal{P} liegen und über die der Pfad von u nach v läuft. Gäbe es keinen solchen Knoten, dann wäre die Vorbedingung nicht erfüllt, weil nur Kanten auf den Pfaden \mathcal{P} keine antiparallele Kante haben. Nach dem Hinzufügen der Kante (u, v) mit dem resultierenden Alignmentgraphen G' gäbe es dann einen Pfad von y nach x , denn $(y, v), (v, u), (u, x) \in E^*$. Daraus folgt dann $x \rightleftharpoons^* y$, also eine Koinzidenz zwischen x und y vom selben Pfad P_i , wodurch die Regularität von G' verletzt ist. \square

Sei ein Symbol s aus der Sequenz S_i mit korrespondierendem Knoten v aus dem Alignmentgraphen gegeben. Dann sind genau die Symbole einer zweiten Sequenz S_j mit s alignierbar, die zwischen $P(v)[j] + 1$ und $S(v)[j] - 1$ liegen. Das liegt an einer Beobachtung, die wir bereits zu Beginn dieses Unterabschnitts gemacht haben: „Für Elemente x und y auf zwei Pfaden P_i und P_j kann man sich leicht überlegen, dass aus $\text{pos}(x) \leq P(y)[i]$ folgt, dass $(x, y) \in E^*$ gilt. Die gleiche Aussage folgt aus $\text{pos}(y) \geq S(x)[j]$.“ Haben wir jetzt einen Knoten u auf P_j mit $P(v)[j] + 1 \leq u \leq S(v)[j] - 1$, dann gilt $u \rightleftharpoons^* v$ und die beiden korrespondierenden Symbole sind nach dem letzten Lemma miteinander alignierbar. Diese Überprüfung ist in $O(1)$ Zeit möglich. Wie bereits angedeutet, entsprechen die Transitivitätsgrenzen aus dem Kontext der Graphen genau denen auf unseren Sequenzen, denn der größte Vorgänger $P(u)[i]$ von Knoten $u \in V$ auf dem Pfad P_i ist, wie wir gezeigt haben, gleichzeitig auch der am weitesten rechts stehende Knoten v , für den in unserem Alignment $v \preceq_{\mathcal{A}} u$ gilt. Es folgt $P(u)[i] = \text{Pred}_{\mathcal{A}}(u, i)$ und für die Nachfolgergrenzen gilt Analoges.

3.5.9 Korollar

Für eine Menge an Sequenzen $S = \{S_1, \dots, S_n\}$ und zugehörigen Alignmentgraphen mit SSDP (G, P) kann die transitive Hülle von G in $O(n^3 \cdot L + n^2 \cdot L^2)$ Zeit und mit $O(n^2 \cdot L)$ Speicherplatz erhalten werden, wobei L die maximale Länge aller Sequenzen ist.

Beweis. Da (G, P) regulär ist, enthält jeder Anker höchstens einen Pfad aus P . Die Anzahl der Kanten pro Anker ist also beschränkt durch das Doppelte der Anzahl an möglichen Paaren zwischen den Sequenzen, denn für zwei alignierte Symbole werden zwischen den dazugehörigen Knoten auch zwei Kanten hinzugefügt. Von diesen $n \cdot (n - 1)$ Kanten können aber nur $2 \cdot (n - 1)$ -viele für Aktualisierungen im Algorithmus EdgeAddition sorgen. Das liegt daran, dass jeder Knoten nur mit $(n - 1)$ neuen Knoten verbunden werden kann. Alle weiteren Kanten ändern die transitive Hülle des Alignmentgraphen nicht und werden direkt in Zeile 2 von Algorithmus 4 abgefangen.

Die maximale Anzahl an möglichen Kanten wird erreicht, wenn $O(L)$ Anker vorliegen, die jeweils Symbole aus möglichst vielen Sequenzen enthalten. Es gibt zwar Alignments mit deutlich mehr Ankern (bis zu $O(n \cdot L)$), aber das ginge mit einer Reduzierung der zu überprüfenden Kanten einher. Im schlimmsten Fall kommt es also zu $O(n \cdot L)$ recheninten-

3. Das DIALIGN-Verfahren

siven Aufrufen von `EdgeAddition`. Erinnern wir uns an die Laufzeit von `EdgeAddition` auf unserem Graphen: $O(n^2 \cdot (\mu - \mu_0) + v \cdot \min\{v, \mu - \mu_p\})$, mit $\mu - \mu_0$ der Anzahl an hinzugefügten Verbindungen, v der Anzahl an Stellen aller Sequenzen und $\mu - \mu_p$ der Anzahl an Kanten zwischen allen Knoten, die nicht zur gerade betrachteten Sequenz gehören. $\mu - \mu_p$ liegt im schlimmsten Fall über v , sodass dieses als Minimum im entsprechenden Term ausgewählt wird. Es gelten $\mu - \mu_0 \in O(n \cdot L)$ und $v \in O(n \cdot L)$. Die Laufzeit von `EdgeAddition` aller Kanten im rechenintensiven Fall liegt also in $O(n^3 \cdot L + n^2 \cdot L^2)$. Die anderen Kanten, die nicht in Zeile 42 abgefangen werden, sind nur $O(n^2 \cdot L)$ -viele und da ihre Bearbeitung nur konstante Zeit kostet, beträgt die Laufzeit auch insgesamt $O(n^3 \cdot L + n^2 \cdot L^2)$ Zeit.

Während des Algorithmus müssen wir stets unseren Alignmentgraphen vorhalten. Dieser enthält für jede Stelle einen Knoten, also $O(n \cdot L)$ -viele, und jeweils $O(n \cdot L)$ Kanten für den Pfad über jede Sequenz. Im Worst-Case kommen dazu jeweils bis zu $O(n^2)$ Verbindungen zwischen den Symbolen dieser Zuweisungsspalte für die $O(L)$ Anker. Der benötigte Speicherplatz beträgt somit $O(n^2 \cdot L)$. \square

Die Schlussfolgerung des letzten Satzes ist, dass die Berechnung der Transitivitäts- und somit Konsistenzgrenzen für ein ganzes multiples Alignment in $O(n^3 \cdot L + n^2 \cdot L^2)$ Zeit und mit $O(n^2 \cdot L)$ Speicherplatz möglich ist.

3.5.3. Zusätzliche Einsparungen an Speicherplatz

Durch ein paar geschickte Beobachtungen ist es Abdeddaïm und Morgenstern gelungen, die Laufzeit und den Speicherplatz für die DIALIGN-Implementierung mit GABIOS-LIB weiter zu verbessern[AM00]. Diese werden im Folgenden kurz vorgestellt. Wenn zwei Stellen aus \mathcal{S} miteinander aligniert sind, dann folgt daraus automatisch, dass ihre Transitivitätsgrenzen identisch sind. Das nutzen wir aus, indem wir nicht die Grenzen für jede Stelle speichern und aktualisieren, sondern stattdessen für ganze Äquivalenzklassen $[x]_{\mathcal{A}}$ unseres Alignments.

Die zweite Verbesserung zielt auf verwaiste Stellen ab, das heißt solche, die mit keiner anderen aligniert sind. Sei $x = (i, p)$ ein solcher Waise aus der Sequenz S_i an der Stelle p . Dann stimmen die Nachfolgergrenzen von x genau mit denen der am weitesten links stehenden Stelle $y = (i, p')$ mit $p < p'$ überein, sodass y kein Waise ist. Jetzt genügt es, ein Feld mit Werten $\text{nextClass}[x] = p'$ für alle Waisen unserer Sequenzen zu speichern. Dadurch ist es uns möglich, die Transitivitätsgrenzen $\text{Succ}_{\mathcal{A}}(x, j)$ dieser Stellen in konstanter Zeit zu aktualisieren, wenn eine neue Zuweisung zwischen unseren Sequenzen und somit eine neue Kante in unserem Alignmentgraphen hinzugefügt wird.

Möglicherweise lässt sich dieses Array auch durch eine Baum- oder andere Datenstruktur ersetzen, die es uns ermöglicht Einträge zu löschen, nachdem die entsprechenden Stellen keine Waisen mehr sind. Das verhindert, dass beim Alignieren von sehr ähnlichen Sequenzen viel Speicher durch Arrays belegt ist, deren Einträge nie wieder benötigt werden. Dieser Ansatz könnte insbesondere deshalb gut funktionieren, weil Stellen innerhalb eines Intervalls zwischen zwei Nichtwaisen die gleichen Vorgänger und Nachfolger haben. Eine Möglichkeit wäre es, einen AVL- oder B-Baum pro Sequenz über der Ordnung der Startpunkte aller Intervalle zu konstruieren. Jedes Knotenelement speichert dann zusätzlich seinen Endpunkt, sowie Vorgänger und Nachfolger. Wird ein neues Fragment ins Alignment eingefügt, wird das Intervall höchstens in zwei neue aufgeteilt, was die Löschung eines und das Hinzufügen zwei neuer Knoten zur Folge hätte. Asymptotisch wäre die Laufzeit vermutlich schlechter, aber durch den mitunter deutlich verringerten

Speicherplatz in der Praxis letztendlich besser. Das weiterzuführen ginge aber zu weit und soll hier nicht betrachtet werden.

3.5.4. Einbindung in DIALIGN

Auch wenn dieses Thema in [AM00] nicht behandelt wird, möchte ich kurz darauf eingehen was für den obigen Ansatz zur Überprüfung von Konsistenz im konkreten nötig ist.

DIALIGN ist ein segmentbasiertes Verfahren für multiples Sequenzalignment. Unser Algorithmus ?? `EdgeAddition` ist lediglich in der Lage eine einzelne Kante, die eine symbolweise Zuweisung darstellt, zu unserem Alignmentgraphen hinzuzufügen. Um sicherzustellen, dass ein ganzes Fragment, zu den bisher gewählten Zuweisungen konsistent ist, betrachten wir dieses auf der Ebene einfacher Paare von Stellen. Zunächst überprüfen wir für alle Stellenpaare nacheinander, ob diese alignierbar sind. Falls ja, können wir sie der Reihe nach zum Alignment mit `EdgeAddition` hinzufügen und falls nicht, würde das Fragment für Inkonsistenzen sorgen und wir fügen nichts hinzu. Die Überprüfung kann einmalig für alle Paare am Anfang durchgeführt werden, weil jedes Paar definitiv zu einem eigenen Anker gehört und die Alignierbarkeit nicht durch andere Paare desselben Fragments eingeschränkt wird.

Es mag sein, dass man für die „inneren“ Stellen der Fragmente effizientere Wege als `EdgeAddition` finden kann, um diese zum Alignment hinzuzufügen. In diesem Fall wäre der Algorithmus nur für die beiden Randpaare unseres Fragments nötig.

3.5.5. Evaluation von DIALIGN mit der GABIOS-LIB

Nachdem die GABIOS-LIB in DIALIGN 2.1 integriert wurde, haben Abdeddaïm und Morgenstern die neue Version auf verschiedenen simulierten und echten Datensätzen getestet und mit der vorherigen Version verglichen [AM00]. Die Datensätze umfassten dabei bis zu 200 Sequenzen mit Durchschnittslängen von 100, 63,3 und 119,3 je nach Satz.

Es hat sich herausgestellt, dass die Laufzeit der alten Version sich proportional zu n^4 verhielt, während die von DIALIGN 2.1 sogar besser als n^3 war. Wie nicht anders zu erwarten, wurde der Unterschied bei steigender Anzahl der Sequenzen n tendenziell größer. Die Laufzeit verbesserte sich im besten Fall um den Faktor 120 und im Durchschnitt etwa um den Faktor 10. Insbesondere die höhere Geschwindigkeit bei großen Alignments mit mehr Sequenzen ist erfreulich, da diese ohnehin komplexer zu berechnen sind.

Ein weiterer Vorteil ist der verringerte Speicherverbrauch im Verhältnis zur alten Version 2.0. Zwar beträgt der Speicherverbrauch der neuen Implementierung im schlimmsten Fall nach wie vor $O(n^2 \cdot L)$, was zuvor der echte benötigte Speicher war. In der Praxis sank er aber um einen konstanten Faktor abhängig von der Ähnlichkeit der alignierten Sequenzen (ausgenommen randomisierte Sequenzen). Die Anzahl n hatte hierbei keinen signifikanten Einfluss auf den Grad der Verbesserung. Dieser lag bei den nichtrandomisierten Datensätzen etwa zwischen fünf und zehn.

3.5.6. Beispiel zu Konsistenzgrenzen

Für die Konsistenzgrenzen brauchen wir in jedem Schritt unseren Alignmentgraphen, alle Äquivalenzklassen unseres Alignments, deren Vorgänger- und Nachfolgergrenzen und die Felder `nextClass` und `prevClass` für alle Waisen. Der Übersichtlichkeit halber wurden nicht die ganzen Felder angegeben, sondern nur die Werte ungleich „NIL“. Zur

3. Das DIALIGN-Verfahren

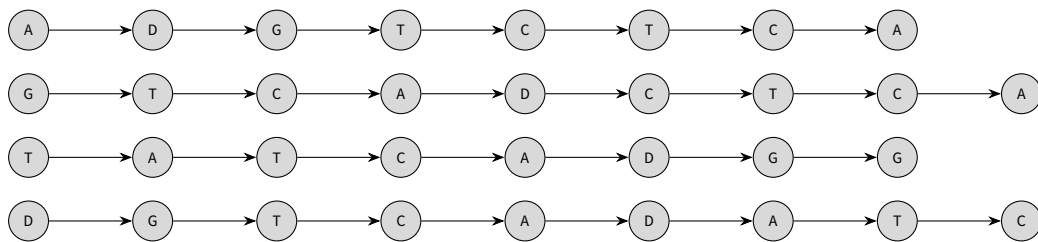
Erinnerung hier nochmal der aktuelle Zwischenstand mit unseren Fragmenten sortiert nach Überlappgewichten.

Seq.	Frag.	Ü-Gew.	Seq.	Frag.	Ü-Gew.	Seq.	Frag.	Ü-Gew.
2	GTCADCTC	69	1	TCTCA	41	1	GT	20
4	GTCADATC		3	TATCA		2	GT	
3	TCAD	47	1	CTCA	34	1	TC	20
4	TCAD		2	CTCA		4	TC	
2	TCAD	44	1	DGTC	31			
3	TCAD		4	DGTC				

Diese werden wir jetzt der Reihe nach in unseren Alignmentgraphen einfügen, wenn die Konsistenz dadurch erhalten bleibt.

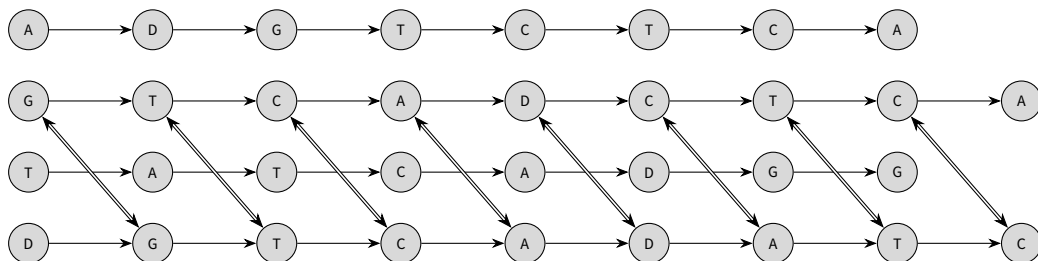
Ursprungszustand

Vor dem ersten Schritt enthält der Alignmentgraph genau unsere Stellen S mit den Pfaden \mathcal{P} , die der natürlichen Ordnung auf den jeweiligen Sequenzen entsprechen. Weil es noch keine Nichtweisen gibt, können wir die Felder `nextClass` und `prevClass` zunächst ignorieren, da es keine Stellen gibt, auf die diese verweisen können.



Erstes Fragment

Zu Beginn haben wir das Fragment $\begin{pmatrix} \text{GTCADCTC} \\ \text{GTCADATC} \end{pmatrix}$ zwischen den Sequenzen S_2 und S_4 . Da unser Alignment noch leer ist, bleibt die Konsistenz auf jeden Fall gewahrt. Wir fügen daher die Kanten in unseren Alignmentgraphen ein und berechnen die Vorgänger- und Nachfolgergrenzen für alle Äquivalenzklassen und Waisen.



Um zu verdeutlichen, dass durch doppelte Kanten verbundene Knoten im Sinne unseres Alignments äquivalent sind, wurden diese Verbindungen mit Äquivalenzpfeilen dargestellt.

Bezeichner	$[(2, 1)]_{\mathcal{A}}$	$[(2, 2)]_{\mathcal{A}}$	$[(2, 3)]_{\mathcal{A}}$	$[(2, 4)]_{\mathcal{A}}$
Äq.klasse	$\{(2, 1), (4, 2)\}$	$\{(2, 2), (4, 3)\}$	$\{(2, 3), (4, 4)\}$	$\{(2, 4), (4, 5)\}$
	$[(2, 5)]_{\mathcal{A}}$	$[(2, 6)]_{\mathcal{A}}$	$[(2, 7)]_{\mathcal{A}}$	$[(2, 8)]_{\mathcal{A}}$
	$\{(2, 5), (4, 6)\}$	$\{(2, 6), (4, 7)\}$	$\{(2, 7), (4, 8)\}$	$\{(2, 8), (4, 9)\}$

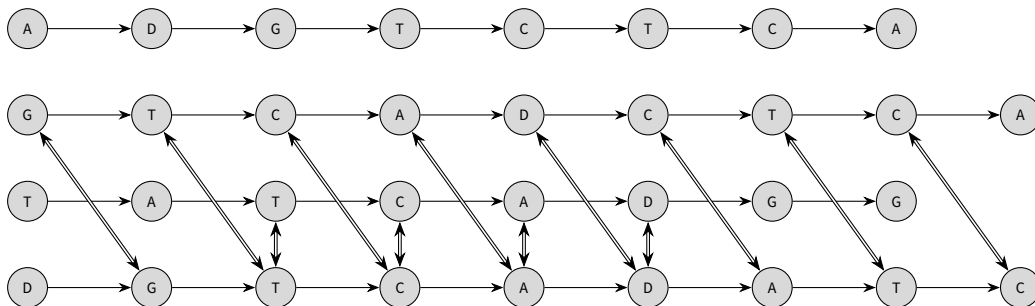
Bei den Waisen werden nur die Stellen beeinflusst, die in den Sequenzen liegen, die bereits ein Fragment enthalten, aber nicht selbst Teil davon sind.

		Pred((i, p), j)				Succ((i, p), j)				prevClass		nextClass	
(i, p)	j	1	2	3	4	1	2	3	4	(i, p)	P((i, p))	(i, p)	S((i, p))
	(i, p)	1	2	3	4	1	2	3	4	(i, p)	P((i, p))	(i, p)	S((i, p))
	$[(2, 1)]_{\mathcal{A}}$	0	1	0	2	9	1	9	2	(2, 9)	8	(4, 1)	1
	$[(2, 2)]_{\mathcal{A}}$	0	2	0	3	9	2	9	3				
	$[(2, 3)]_{\mathcal{A}}$	0	3	0	4	9	3	9	4				
	$[(2, 4)]_{\mathcal{A}}$	0	4	0	5	9	4	9	5				
	$[(2, 5)]_{\mathcal{A}}$	0	5	0	6	9	5	9	6				
	$[(2, 6)]_{\mathcal{A}}$	0	6	0	7	9	6	9	7				
	$[(2, 7)]_{\mathcal{A}}$	0	7	0	8	9	7	9	8				
	$[(2, 8)]_{\mathcal{A}}$	0	8	0	9	9	8	9	9				

Wie nicht anders zu erwarten, wurden die Vorgänger und Nachfolger für alle Sequenzen, die nicht mit einem Fragment verbunden sind, auf 0 beziehungsweise die Länge der Sequenz plus eins gesetzt. Bei allen Ankern ist der Eintrag für die jeweilige Sequenz genau die Position der an dieser Äquivalenzklasse beteiligten Stelle.

Zweites Fragment

Als nächstes fügen wir das Fragment $\binom{\text{TCAD}}{\text{TCAD}}$ aus der dritten und vierten Sequenz ein. Weil die dritte Sequenz noch nicht Teil des multiplen Alignments ist, kann es auch hier zu keinen Inkonsistenzen kommen.



Bezeichner	$[(2, 1)]_{\mathcal{A}}$	$[(2, 2)]_{\mathcal{A}}$	$[(2, 3)]_{\mathcal{A}}$	$[(2, 4)]_{\mathcal{A}}$
Äq.klasse	$\{(2, 1), (4, 2)\}$	$\{(2, 2), (3, 3), (4, 3)\}$	$\{(2, 3), (3, 4), (4, 4)\}$	$\{(2, 4), (3, 5), (4, 5)\}$
	$[(2, 5)]_{\mathcal{A}}$	$[(2, 6)]_{\mathcal{A}}$	$[(2, 7)]_{\mathcal{A}}$	$[(2, 8)]_{\mathcal{A}}$
	$\{(2, 5), (3, 6), (4, 6)\}$	$\{(2, 6), (4, 7)\}$	$\{(2, 7), (4, 8)\}$	$\{(2, 8), (4, 9)\}$

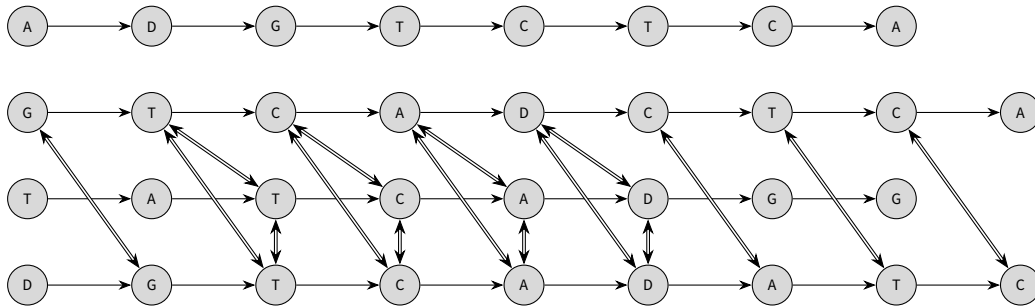
Zu aktualisieren sind die Transitivitätsgrenzen für die dritte Sequenz und die Prev- und NextClass-Einträge der Stellen von S_3 , die vor oder hinter unserem Fragment liegen. Da diese jeweils am Start oder Ende positioniert sind, ist nur einer der beiden Einträge relevant.

3. Das DIALIGN-Verfahren

		Pred((i, p), j)				Succ((i, p), j)				prevClass		nextClass	
(i, p)	j	1	2	3	4	1	2	3	4	(i, p)	P((i, p))	(i, p)	S((i, p))
[(2, 1)] _A		0	1	0	2	9	1	3	2	(2, 9)	8	(4, 1)	1
[(2, 2)] _A		0	2	3	3	9	2	3	3	(3, 7)	6	(3, 1)	3
[(2, 3)] _A		0	3	4	4	9	3	4	4	(3, 8)	6	(3, 2)	3
[(2, 4)] _A		0	4	5	5	9	4	5	5				
[(2, 5)] _A		0	5	6	6	9	5	6	6				
[(2, 6)] _A		0	6	6	7	9	6	9	7				
[(2, 7)] _A		0	7	6	8	9	7	9	8				
[(2, 8)] _A		0	8	6	9	9	8	9	9				

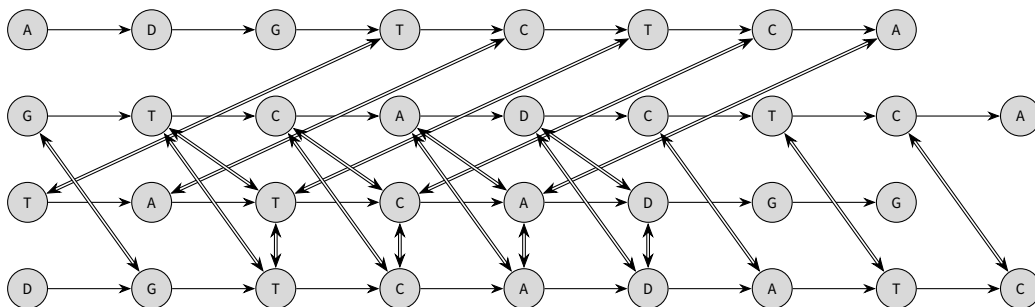
Drittes Fragment

In diesem Schritt fügen wir das Fragment $\begin{pmatrix} \text{TCAD} \\ \text{TCAD} \end{pmatrix}$ aus S_2 und S_3 ein. Hier fügen wir nur zusätzliche Kanten in bereits existierende Anker ein. Das hat auch zur Folge, dass sich die Vorgänger- und Nachfolgergrenzen nicht verändern können, weil bereits in beide Richtungen Kanten existierten (s. Algorithmus 4).



Viertes Fragment

Nun fügen wir das Fragment $\begin{pmatrix} \text{TCTCA} \\ \text{TATCA} \end{pmatrix}$ aus der ersten und dritten Sequenz ein. Auch hier kann es wieder zu keinen Inkonsistenzen kommen, weil S_1 noch nicht Teil des Alignments war.



Bezeichner	[(2, 1)] _A	[(2, 2)] _A	[(2, 3)] _A
Äq.klasse	{(2, 1), (4, 2)}	{(2, 2), (3, 3), (4, 3), (1, 6)}	{(2, 3), (3, 4), (4, 4), (1, 7)}
	[(2, 4)] _A	[(2, 5)] _A	[(2, 6)] _A
	{(2, 4), (3, 5), (4, 5), (1, 8)}	{(2, 5), (3, 6), (4, 6)}	{(2, 6), (4, 7)}
	[(2, 7)] _A	[(2, 8)] _A	[(1, 4)] _A
	{(2, 7), (4, 8)}	{(2, 8), (4, 9)}	{(1, 4), (3, 1)}
	[(1, 4)] _A		
	{(1, 4), (3, 1)}		

		Pred((i, p), j)				Succ((i, p), j)				prevClass		nextClass	
(i, p)	j	1	2	3	4	1	2	3	4	(i, p)	P((i, p))	(i, p)	S((i, p))
	[(2, 1)] _A	0	1	0	2	6	1	3	2	(2, 9)	8	(4, 1)	1
	[(2, 2)] _A	6	2	3	3	6	2	3	3	(3, 7)	6	(3, 1)	3
	[(2, 3)] _A	7	3	4	4	7	3	4	4	(3, 8)	6	(3, 2)	3
	[(2, 4)] _A	8	4	5	5	8	4	5	5			(1, 1)	4
	[(2, 5)] _A	0	5	6	6	9	5	6	6			(1, 2)	4
	[(2, 6)] _A	0	6	6	7	9	6	9	7			(1, 3)	4
	[(2, 7)] _A	0	7	6	8	9	7	9	8				
	[(2, 8)] _A	0	8	6	9	9	8	9	9				
	[(1, 4)] _A	4	0	1	0	4	2	1	3				
	[(1, 5)] _A	5	0	2	0	5	2	2	4				

Weitere Fragmente

Die restlichen Fragmente unserer paarweisen Alignments sind leider nicht konsistent zu unserem bisherigen multiplen Alignment. Betrachtet man $\binom{GT}{GT}$ zwischen S_1 und S_2 , das als drittnächstes an der Reihe ist, stellt man fest, dass die jeweiligen Stellen nicht alignierbar sind. Für $(1, 2) = (G)$ ist das Alignieren vorerst möglich, denn $\text{NextClass}((1, 3)) = 4$ und $\text{Succ}((1, 4), 2) - 1 = 1$. Für $(1, 3) = (T)$ gilt das nicht mehr, denn $\text{Succ}((1, 4), 2) - 1 = 1 < 2$. Für die anderen drei übrigen Fragmente gilt Analoges.

3.6. Abschluss des Verfahrens

Nach diesem ersten Durchlauf unseres Ansatzes sind wir jedoch noch nicht fertig. Es kann beispielsweise sein, dass wir ein wichtiges Motiv haben, dass in mehreren Sequenzen vorkommt und somit Teil unseres multiplen Alignments sein sollte. Bei zwei Sequenzen war es jedoch nicht im paarweisen Alignment enthalten, weil stattdessen ein zufälliges, aber größeres Fragment ausgewählt wurde. Wenn wir Glück haben, findet dieses aber nicht den Weg in unser multiples Alignment, weil es im Vergleich zu anderen Fragmenten, mit denen es inkonsistent war, ein geringeres Gewicht hat. Deshalb führen wir zwischen allen Teilsequenzen, die durch unsere Ankerpunkte vorgegeben sind, unser DIALIGN-Verfahren erneut durch und wiederholen dies, bis es keine neuen Fragmente mit positivem Gewicht mehr gibt [MDW96]. In der Praxis stellt man fest, dass es üblicherweise zu höchstens drei Iterationen kommt [Mor99]. Wir können daher annehmen, dass die Anzahl an Durchläufen unseres Verfahrens konstant ist und für die Laufzeit nicht weiter in Betracht gezogen werden muss.

Denken wir an unser Beispiel zurück, dann stellen wir fest, dass das Fragment $f_{3,2,2} = \binom{DG}{DG}$ aus der ersten und vierten Sequenz das positive Gewicht 2 hat. Es kann also unter Aktualisierung unseres Alignmentgraphen in unser multiples Alignment aufgenommen werden. Weitere geeignete Fragmente der Teilsequenzen gibt es nicht. Bei der nächsten Iteration stellt man demnach fest, dass kein neues Fragment ein positives Gewicht hat und wir können das Alignieren abbrechen.

Als abschließenden Schritt müssen wir die Ausgabe des Alignments vorbereiten. Dabei werden alignierte Symbole als Groß- und Waisen als Kleinbuchstaben dargestellt. Zudem sollen die Zuweisungsspalten genau übereinander stehen, wofür unter Umständen das Einfügen von Leerzeichen in die Ausgabesequenzen nötig ist. Hierfür sortieren wir alle

3. Das DIALIGN-Verfahren

Fragmente für jede Sequenz nach Startpunkten und traversieren diese, sowie die Sequenzen selbst, der Reihe nach durch. Bei Bedarf werden Lücken eingefügt. Da die Länge jeder Sequenz in $O(1)$ ist, ist dies in $O(n^2 \cdot L)$ möglich [Mor99].

Das finale Alignment unserer vier Beispielsequenzen mit DIALIGN 2.2 und einer +3/−1-Substitutionsmatrix sieht dann so aus:

1. aDGTCTCA-----
2. --G--TCADCTCa
3. ---TATCADgg--
4. -DG--TCADATC-

3.6.1. Gesamtkomplexität

Weil wir jetzt das komplette DIALIGN-Verfahren kennen, können wir abschließend die Laufzeit aller Teilschritte zusammenfassen und die Gesamtkomplexität bestimmen.

3.6.1 Korollar

Mit DIALIGN lässt sich ein multiples Sequenzalignment in $O(n^3 \cdot L + n^2 \cdot L^2)$ Zeit und mit $O(N_{\max} + n^2 \cdot L)$ Speicherplatz berechnen.

Beweis. Wir gehen davon aus, dass die Anzahl an Iterationen wie oben beschrieben in $O(1)$ liegt. Es folgt, dass die Laufzeit einer Iteration asymptotisch auch der Gesamtlaufzeit entspricht.

Mit unserem speichereffizienten Algorithmus lässt sich jedes paarweise Alignment in $O(L^2)$ Zeit und mit $O(N_{\max}) \in O(L^2)$ Speicherplatz berechnen [Mor02]. Da es $O(n^2)$ paarweise Alignments gibt, folgt hierfür die Laufzeit in $O(n^2 \cdot L^2)$. Die Werte für unsere Fragmente speichern wir sortiert in einer $O(n^2)$ großen Tabelle, wobei jeder Eintrag auf die Liste von Fragmenten eines paarweisen Alignments verweist. Da jedes von diesen bis zu $O(L)$ Segmente enthält, folgt der Speicherverbrauch von $O(n^2 \cdot L)$ zu diesem Zeitpunkt.

Mit Hilfe der Tabelle von sortierten Fragmenten und dem parallelen Traversieren über diese können wir in-place und in $O(n^3 \cdot L)$ Zeit unsere Überlappgewichte berechnen. Diese Verbesserung von mir ist wichtig, weil sonst der naive Ansatz mit Laufzeit $O(n^4 \cdot L^2)$ die Gesamtkomplexität dominiert hätte [Mor99]. Bevor wir die Fragmente gierig in unser multiples Alignment einfügen können, müssen wir sie alle auf Basis ihrer Überlappgewichte sortieren. Mit einem effizienten Algorithmus wie beispielsweise Heapsort ist dies in $O(n^2 \cdot L \cdot \log(n^2 \cdot L))$ Rechenschritten möglich.

Im vorletzten Schritt von DIALIGN konstruieren wir unseren Alignmentgraphen und benutzen ihn, um die Transitivitäts- und somit die Konsistenzgrenzen zu berechnen. Er enthält $O(n \cdot L)$ Knoten mit bis zu $O(n^2 \cdot L)$ Kanten und, wie in Satz 3.5.4 bewiesen, kostet das Aktualisieren der Transitivitätsgrenzen $O(n^3 \cdot L + n^2 \cdot L^2)$ Rechenschritte. Das Vorbereiten der Ausgabe ist wie gerade erwähnt in $O(n^2 \cdot L)$ Zeit möglich.

Somit dominieren die Konsistenzgrenzen die Laufzeit und je nach N_{\max} in unseren paarweisen Alignments auch den Speicherverbrauch. Es folgt die behauptete Laufzeit von $O(n^3 \cdot L + n^2 \cdot L^2)$ Rechenschritten und der benötigte Speicherplatz von $O(N_{\max} + n^2 \cdot L)$. \square

3.7. Evaluierung, Zusammenfassung und Schwächen des Ansatzes

3.7.1. Evaluierung

DIALIGN wurde im Laufe der Zeit und nach jeder neuen Verbesserung ausführlichen Tests und Vergleichen mit anderen Programmen für multiple Sequenzalignments unterzogen. Diese werden im Folgenden kurz zusammengefasst vorgestellt.

DIALIGN 1.0 wurde zunächst an einem Satz von elf DNA-Sequenzen getestet, die jeweils Helix-Loop-Helix-Bindungsstellen für Proteine haben [MDW96]. Diese Bindungsstellen mit einer Länge von etwa 30 DNA-Basen wurden experimentell gefunden und außerhalb dieser Regionen existieren keine erkennbaren Ähnlichkeiten zwischen den Sequenzen. Während DIALIGN in der Lage war, alle elf Sequenzen korrekt miteinander zu alignieren, waren das Optimum der anderen Verfahren zwei korrekte Zuordnungen. Die verglichenen Programme waren dabei DFALIGN, PILEUP, CLUSTAL und GENALIGN. Auch bei den Vergleichen mit elf Programmen zum Alignieren von Proteinsequenzen schnitt DIALIGN neben CLUSTAL V und DFALIGN am besten ab.

Es ist sinnvoll, bei zu alignierenden Sequenzen zwischen lokal und global verwandten Sequenzen zu unterscheiden. Lokal verwandte Sequenzen haben nur Ähnlichkeiten in begrenzten Abschnitten, während die restlichen Bereiche höchstens zufällige Übereinstimmungen enthalten. Hier ist es optimal, lediglich die ähnlichen Segmente ins Alignment aufzunehmen und die nicht verwandten zu ignorieren. Global verwandte Sequenzen haben hingegen Ähnlichkeiten, die sich über die volle Länge der Sequenzen ziehen und wo es nur vereinzelt zu Deletionen, Insertionen oder Punktmutationen kommt.

Beim Testen von DIALIGN 2.0 an verschiedenen Testsequenzen wurde festgestellt, dass DIALIGN 1 und 2.0 auf global verwandten Sequenzen vergleichbar zu globalen Alignern wie CLUSTAL W und DCA sind [MAHD98]. Bei lokal verwandten Sequenzen ist DIALIGN 2.0 allen anderen getesteten Programmen hingegen weit überlegen. Ein weiterer Vorteil von DIALIGN 2.0 ist die Unabhängigkeit von benutzerdefinierten Eingaben. Das gilt für den Vorgänger und viele der anderen getesteten Programme nicht.

Da große Alignments sehr rechenintensiv sein können, ist es außerdem wichtig die Laufzeit der Verfahren im Auge zu behalten. Progressive Alignierer wie beispielsweise CLUSTAL W verwenden nach dem Berechnen paarweiser Alignments zunächst die beiden ähnlichsten Sequenzen und fügen dann der Reihe nach die jeweils ähnlichste verbleibende Sequenz ins multiple Alignment ein, bis alle Sequenzen Teil der Zuordnung sind. Die erste Version von DIALIGN hatte eine Laufzeit, die etwa um den Faktor 100 langsamer war als vergleichbare globale Alignierer. Durch die Verwendung des graphtheoretischen Ansatzes für die Konsistenzgrenzen von Abdeddaïm konnte dieser Unterschied in etwa um den Faktor zehn gesenkt werden [AM00]. Es ist denkbar, dass die speichereffiziente Berechnung der paarweisen Alignments die Lücke weiter geschlossen hat, indem aufgrund des geringeren Speicherverbrauchs weniger Seitenfehler und damit weniger teure I/O-Operationen auftreten.

3.7.2. Zusammenfassung

Wir haben in diesem Kapitel den DIALIGN-Ansatz für multiple Sequenzalignments kennengelernt. DIALIGN erstellt multiple Alignments, indem zuerst mit einem speichereffizienten Algorithmus über dynamische Programmierung paarweise Alignments berechnet werden.

3. Das DIALIGN-Verfahren

Mit Hilfe des parallelen Traversierens über sortierte Listen können wir dann effektiv die Überschneidungen der Fragmente finden und diese damit neu gewichten. Nachdem DIALIGN die Fragmente nach ihren Gewichten sortiert hat, werden sie der Reihe nach in das multiple Alignment und den Alignmentgraphen eingefügt, vorausgesetzt, die Konsistenz wird durch sie nicht verletzt. Die so entstandenen Anker wählt DIALIGN als Grenzen für Teilsequenzen und führt zwischen diesen iterativ das selbe Verfahren solange durch, bis es keine Fragmente mit positiven Gewichten mehr gibt. Zum Schluss wird die Ausgabe konstruiert, indem nichtalignierte Symbole klein und alignierte groß geschrieben, sowie Lücken in die Sequenzen eingefügt werden, sodass alle Stellen eines Ankers genau in einer Spalte stehen.

DIALIGN aligniert nur die Segmente der Sequenzen miteinander, die auch wirklich ähnlich zueinander sind, während globale Alignierer selbst dann versuchen die ganzen Sequenzen einander zuzuordnen, wenn es nur lokale Übereinstimmungen gibt. Das bietet einen großen Vorteil bei lokal verwandten Sequenzfamilien. Viele Algorithmen speziell für lokale Alignments, wie beispielsweise der auf Needleman-Wunsch basierende Smith-Waterman-Algorithmus, sind nur in der Lage eine einzige Region mit Übereinstimmungen zu finden. DIALIGN hingegen kann auch mehrere weit voneinander entfernte lokale Übereinstimmungen finden oder gleich globale Alignments mit angemessener Genauigkeit berechnen [MDW96]. In diesem Sinne ist er ein sehr flexibler Algorithmus, der für eine Vielzahl an Anwendungen verwendbar ist.

Erinnern wir uns zurück an die gängigsten Mutationen, die auf den von uns untersuchten Sequenzen vorkommen: Deletionen und Insertionen von ganzen Abschnitten oder Punktmutationen, bei denen einzelne Basen oder Aminosäuren durch andere ersetzt werden. Man stellt fest, dass jede dieser Situationen sich in DIALIGN wiederfindet. Punktmutationen zeigen sich durch Abweichungen einzelner Stellen in längeren Fragmenten und bei gelöschten oder eingefügten Segmenten teilt DIALIGN ein einzelnes längeres Fragment in zwei oder mehr kürzere aufgeteilt wird [MFDW97]. Es ist außerdem anzunehmen, dass der segmentbasierte Ansatz von DIALIGN für die Benutzer angenehmer ist, als dass nicht in jedem Fall versucht wird die kompletten Sequenzen in ein Alignment einzufügen. Stattdessen können Abschnitte ohne Zuweisung bleiben, wenn es keine Ähnlichkeiten zu anderen Bereichen gibt. Man stellt fest, dass es für einen Alignierer fast genauso wichtig ist, nichtverwandte Abschnitte nicht zuzuordnen, wie es wichtig ist, dies für verwandte zu tun, denn sonst muss der Forscher, der das Alignment später benutzt, erst mühsam von Hand feststellen, welche Abschnitte die gesuchten Motive sind [Mor99].

3.7.3. Schwächen von DIALIGN

Es gibt im Allgemeinen zwei Gründe, warum automatisierte Alignmentverfahren wie beispielsweise DIALIGN biologisch unzureichende Ergebnisse liefern können: Entweder bildet die Gütefunktion, also in unserem Fall der Score unseres Alignments, die Wirklichkeit unzureichend ab und weist bedeutungslosen Abschnitten größere Werte zu, als anderen wichtigen Motiven, oder die Gütefunktion funktioniert grundsätzlich richtig, aber dafür werden beim Zusammensetzen des multiplen Alignments die falschen Fragmente ausgewählt. In diesem Fall liegt das Problem in unserer Heuristik, die die Fragmente gierig nach Gewicht und Konsistenz auswählt.

Um festzustellen, wie sich DIALIGN weiter verbessern lässt, muss man zuerst die Güte unserer Ergebnisse quantifizieren und anschließend überprüfen, ob die obigen Situationen

auftreten. Bezüglich der Quantifizierung gibt es zunächst zwei verschiedene Möglichkeiten festzustellen, ob und wie gut ein Alignment ist. Als erstes brauchen wir dafür fertige Alignments zum Vergleich, von denen wir wissen, dass sie korrekt sind. Solche finden sich beispielsweise in Testdatenbanken wie BALiBASE, die eine Vielzahl von Zuordnungen auf unterschiedlichen Klassen von Sequenzen bieten. Das erste Gütekriterium ist der *Sum-of-Pairs-Score*, der in Prozent angibt, wie viele paarweise korrekte Übereinstimmungen es im Vergleich zur Referenz gab. Die zweite Möglichkeit ist der *Column-Score*, der überprüft, wie viele ganze Spalten korrekt aligniert wurden [MPDS06]. Grundsätzlich ist letzterer das bessere Maß, weil wir Ähnlichkeiten über die komplette Menge an Sequenzen hinweg finden wollen. Es kann jedoch passieren, dass in beinahe jeder Spalte eine einzige fehlerhafte Zuordnung auftritt, was in einem sehr niedrigen Column-Score resultieren würde, obwohl das Alignment gut ist.

Morgenstern et al. haben DIALIGN auf einer Vielzahl von Sequenzen untersucht, um festzustellen, welche Probleme beim Alignieren auftreten [MPDS06]. Unglücklicherweise treten beide der oben genannten Fälle auf, abhängig von den zu alignierenden Sequenzen. Bei der Sequenzanalyse einer Pufferfischart kam es aufgrund sogenannter *Tandemduplikate* zu schlechten Ergebnissen. Tandemduplikate sind gleiche oder sehr ähnliche Abschnitte, die an mehreren Stellen innerhalb der Sequenzen vorkommen. Im schlimmsten Fall kommt es dann dazu, dass die falschen ähnlichen Genabschnitte miteinander aligniert werden. Weil diese sehr ähnlich sind, ist es wahrscheinlich, dass sie einander zugewiesen werden und die Alignments hohe Gewichte haben. Biologisch sind diese Zuweisungen aber von geringem Wert, weil es nicht die richtigen Paare von Genen in unserem Alignment sind.

Genau diese Erfahrung hat man auch beim Pufferfisch *Takifugu rubripes* gemacht. Das DIALIGN-Ergebnis hatte zwar einen um 13% höheren Score als das korrekte Ergebnis, der Column-Score lag dagegen bei 0% und selbst die Residuenpaare waren nur zu 33% richtig. Ergebnisse wie dieses sind ein klares Ergebnis dafür, dass die Gütefunktion von DIALIGN in manchen Fällen versagt. Bei diesem extremen Beispiel ist es aufgrund der geringeren Korrelation zwischen der mathematischen und der biologischen Ähnlichkeit der gesuchten Homologien schwer eine entsprechende Gütefunktion zu finden.

Mögliche Ansätze der Verbesserung können Machine Learning oder semiautomatisierte Verfahren sein, wo ein Mensch mit Expertenwissen bestimmte Abschnitte von Hand zuweist und lediglich die Bereiche dazwischen maschinell aligniert werden [MPDS06]. Man hat jedoch auch weitere Sequenzfamilien in BALiBASE gefunden, bei denen der Score bei schlechteren Alignments stieg. In diesem Fall kann man über bessere Gütefunktionen nachdenken, weil bessere Heuristiken das Problem nicht lösen. Schließlich basieren sie auf den Ergebnissen der anscheinend unzureichenden Gütefunktionen.

Bei anderen Sequenzen hat man hingegen festgestellt, dass die korrekten Alignments Scores haben können, die bis zu 15% über den Ergebnissen von DIALIGN liegen. In diesem Fall ist das Problem vermutlich die Heuristik, die die Fragmente mit den höchsten Gewichten gierig wählt. Es kann passieren, dass DIALIGN so in einem lokales Maximum endet, indem es Fragmente wählt, die hohe Gewichte, aber geringen biologischen Wert haben und über Inkonsistenzen verhindern, dass andere bedeutungsvollere Zuweisungen gewählt werden. Auch mathematisch kann der gierige Ansatz suboptimale Ergebnisse liefern, indem ein einziges großes Fragment das Hinzufügen mehrerer kleiner verhindert, die summiert ein größeres Gesamtgewicht hätten. Weil das nicht optimale, große Fragment nie wieder aus unserem multiplen Alignment entfernt werden kann, sind wir auch

3. Das DIALIGN-Verfahren

nicht in der Lage die anderen Segmente auszuwählen [Mor99].

Um diesem Problem vorzubeugen, lernen wir im nächsten Kapitel eine neue, verbesserte Heuristik für DIALIGN kennen. Das Verfahren von Corel et al. basiert auf Flussnetzen und weiteren graphtheoretischen Ansätzen, die eine flexiblere Auswahl der Anker des multiplen Alignments ermöglichen[CPM10].

4. Ein Min-Cut-Ansatz für das Konsistenzproblem

Da es, wie im letzten Kapitel gezeigt, auf manchen Sequenzfamilien durch die gierige Heuristik von DIALIGN zu suboptimalen Scores und Alignments kommt, werden wir jetzt einen verbesserten graphtheoretischen Ansatz zur Lösung des Multiple-Sequence-Alignment-Problems von Corel et al. betrachten[CPM10].

Dazu benötigen wir zwei verschiedene Graphen: zum einen den *Inzidenzgraphen*, bei dem alle Stellen Knoten sind und ihre Anker Zusammenhangskomponenten. Zum anderen den *Sukzessionsgraph*, der die Zusammenhangskomponenten unseres Inzidenzgraphen als Knoten und die natürliche Ordnung auf den Sequenzen als Kanten benutzt. Diese beiden Datenstrukturen werden wir benutzen, um Inkonsistenzen aufzulösen. Wenn wir uns an die Definition 3.1.2 der Konsistenz aus dem letzten Kapitel erinnern, dann stellen wir fest, dass es zwei Arten von ihr gibt: zum einen implizite, transitive Mehrfachzuweisungen, bei denen einer Stelle einer Sequenz mehrere Stellen einer anderen Sequenz zugeordnet sind, und zum anderen überkreuzte Zuweisungen.

Als Ausgangspunkt starten wir wieder mit unseren paarweisen Alignments aus DIALIGN. Überlappgewichte brauchen wir in diesem Fall nicht, weil Überschneidungen mehrerer Fragmente auf anderem Weg gefunden werden. Wir konstruieren mit Hilfe dieser Zuweisungen unseren Inzidenzgraphen und benutzen einen Algorithmus zur Berechnung des minimalen Schnitts („min-cut“) auf den Zusammenhangskomponenten, um alle Inkonsistenzen aufgrund von transitiven Mehrfachzuweisungen aufzulösen. Die so entstehenden Zusammenhangskomponenten benutzen wir, um einen Sukzessionsgraphen aufzubauen. Dank eines Algorithmus von [PDC10] können wir Überkreuzungen aus unserer Relation löschen. Alle dieser Konzepte werden wir im Laufe dieses Kapitel formal definieren, genauer analysieren und die Korrektheit der Aussagen beweisen.

4.1. Flussnetzwerke

4.1.1. Einführung

Flussnetzwerke haben eine Vielzahl von realweltlichen Anwendungen. Man kann mit ihnen Straßen- oder Schienennetze modellieren. Auch chemische Produktionsstraßen mit vielen Rohren, die jeweils nur den Durchfluss einer bestimmten Menge erlauben, oder Stromnetze mit Kraftwerken und Endverbrauchern; zwischen denen es Stromleitungen gibt, die jeweils höchstens einen bestimmten Stromfluss erlauben, lassen sich durch sie darstellen [CLRS09, S.708].

Zunächst betrachten wir Flussnetzwerke auf einer formalen Ebene, dann widmen wir uns kurz und skizziert einigen der wichtigsten Algorithmen zum Berechnen von maximalen Flüssen und zuletzt beweisen wir die Äquivalenz von diesen mit minimalen Schnitten. Diese brauchen wir später zum Auflösen von Inkonsistenzen im Inzidenzgraphen.

4. Ein Min-Cut-Ansatz für das Konsistenzproblem

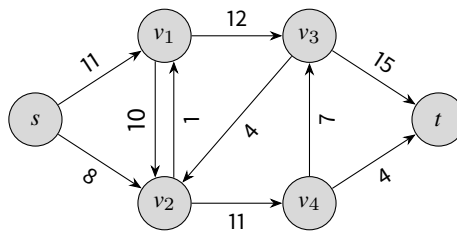


Abbildung 4.1.: Ein Beispiel für ein einfaches Flussnetzwerk mit sechs Knoten.

4.1.1 Definition (Flussnetzwerk[CLRS09, S.709])

Ein Flussnetzwerk ist ein gerichteter Graph $G = (V, E)$ bei dem jeder Kante $(u, v) \in E$ eine nicht-negative Kapazität $c(u, v) \geq 0$ zugeordnet ist und zwei ausgezeichnete Knoten $s, t \in V$ existieren, die wir *Quelle* und *Senke* nennen.

Der Einfachheit halber nehmen wir im Folgenden an, dass jeder Knoten von G auf einem Pfad von s nach t liegt. Sollte es doch solche Knoten geben, dann wären sie ohnehin nicht relevant, weil kein Fluss durch sie von der Quelle zur Senke geschickt werden kann.

4.1.2 Definition (Fluss[CLRS09, S.709])

Sei $G = (V, E)$ mit Kapazitätsfunktion c ein Flussnetzwerk. Dann definieren wir einen Fluss als eine Funktion $f : V \times V \rightarrow \mathbb{R}$, die die folgenden beiden Eigenschaften erfüllt:

Kapazitätsbeschränkung: Für alle Knoten $u, v \in V$ gelte $0 \leq f(u, v) \leq c(u, v)$.

Flusserhaltung: Für alle Knoten $u \in V \setminus \{s, t\}$ gelte

$$\sum_{v \in V} f(v, u) = \sum_{v \in V} f(u, v).$$

Für Knoten $u, v \in V$, die nicht durch eine Kante verbunden sind $((u, v) \notin E)$, setzen wir den Fluss auf 0: $f(u, v) = 0$.

Ein Fluss ist also eine Zuordnung von Werten an die Kanten unseres Flussnetzwerkes, sodass keine Kapazität überschritten wird und in jeden Knoten soviel hinein wie hinaus fließt. Wir nennen auch den die Zahl $f(u, v)$ Fluss zwischen den beiden Knoten u und v .

4.1.3 Definition (Wert eines Flusses[CLRS09, S.710])

Der Wert eines Flusses ist definiert als

$$|f| := \sum_{v \in V} f(s, v) - \sum_{v \in V} f(v, s). \quad (4.1)$$

Der Wert eines Flusses ist also die Summe aller Flüsse aus der Quelle s , von der die Summe der Flüsse in die Quelle abgezogen wird. In den meisten Fällen geht es darum den Fluss mit dem höchstmöglichen Wert zu bestimmen. Diesen nennen wir *maximalen Fluss*.

Viele Autoren setzen voraus, dass keine Kanten in die Senke und keine aus der Quelle führen. Diese Beschränkung ist zwar hilfreich beim Verständnis von Flussnetzwerken, wird aber grundsätzlich nicht benötigt. Man kann sich leicht überlegen, dass solche Kanten den Fluss 0 besitzen müssen in einem maximalen Fluss. Bei den Flussnetzwerken,

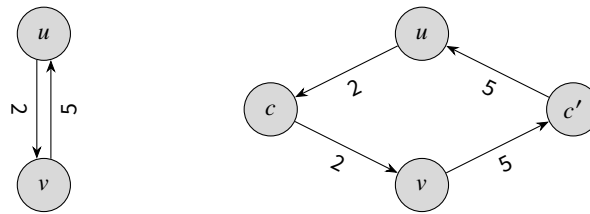


Abbildung 4.2.: Ausschnitt aus einem Flussnetzwerk, bei dem Knoten mit antiparallelen Kanten durch äquivalente Knoten ohne diese ersetzt wurden.

die wir für unseren Algorithmus benutzen, wird es diese Kanten geben, weshalb wir auf die Beschränkung verzichten.

Eine andere Einschränkung, die man in vielen Definitionen sieht, ist der Verzicht auf antiparallele Kanten. Das heißt, dass es gleichzeitig Kanten $(u, v), (v, u) \in E$ gibt. Manche Implementierungen für Algorithmen, die den maximalen Fluss berechnen, sind so programmiert, dass sie vom Benutzer eine Menge von Gegenkanten mit Fluss 0 erwarten, die intern benötigt werden. Grundsätzlich sind antiparallele Kanten aber unproblematisch, weil man jeden Fluss mit positiven Werten auf antiparallelen Kanten in einen Fluss umwandeln kann, bei dem zwischen zwei Knoten höchstens eine Kante einen positiven Fluss hat. Sei beispielsweise $f(u, v) = x, f(v, u) = y$ mit $x \neq 0 \neq y$. Dann kann man einen Fluss mit dem selben Wert definieren, wenn man den Fluss auf den antiparallelen Kanten wie folgt definiert: $f(u, v) = x - \min\{x, y\}, f(v, u) = y - \min\{x, y\}$. Alternativ lässt sich jedes Flussnetzwerk mit antiparallelen Kanten auch in ein äquivalentes übertragen, das keine solchen Kanten enthält, wie man in Abbildung 4.2 sieht.

4.1.2. Wichtige Algorithmen

Es gibt eine Vielzahl von Algorithmen zur Berechnung eines maximalen Flusses auf einem Flussnetzwerk. Die wichtigsten und bekanntesten Vertreter werden hier kurz vorgestellt.

Der erste Algorithmus, der speziell zum Berechnen des maximalen Flusses entwickelt wurde, war der Algorithmus von Ford-Fulkerson [FF56]. Dieser verwendete einen sogenannten *Restwertgraphen*, der für jede Kante im ursprünglichen Flussnetzwerk eine Vorwärts- und eine Rückwärtskante enthält. Die Vorwärtskante hat als Kapazität die der Kante im ursprünglichen Graph minus den Fluss im Flussnetzwerk. Die der Rückwärtskante im Restwertgraphen ist genau die Kapazität des Flusses der zugehörigen Kante im Flussnetzwerk. Für einen Pfad von der Quelle zur Senke im Restwertgraph kann man den Fluss im Flussnetzwerk um die kleinste Kapazität auf diesem Pfad erhöhen, ohne die Kapazitätsbeschränkung zu verletzen. Diese Pfade nennt man *augmentierend* und nach jeder Aktualisierung des Flusses, müssen auch die Kapazitäten im Restwertgraphen angepasst werden. Der Algorithmus von Ford-Fulkerson besucht solange augmentierende Pfade, bis es keine solchen mehr gibt. Ist das der Fall, dann kann der Fluss nicht mehr vergrößert werden und der maximale Fluss wurde berechnet. Der Algorithmus von Ford-Fulkerson hat für einen zusammenhängenden Graphen mit ganzzahligen Kapazitäten eine pseudopolynomielle Laufzeit von $O(|E| \cdot U)$, wobei U die Summe der Kapazitäten der ausgehenden Kanten von der Quelle ist.

Oft wird Ford-Fulkerson eher als eine „Methode“ statt als Algorithmus bezeichnet, weil die Reihenfolge, nach der augmentierende Pfade gewählt werden, nicht spezifiziert ist.

4. Ein Min-Cut-Ansatz für das Konsistenzproblem

In der Folge wurde der Algorithmus von Ford-Fulkerson an mehreren Stellen verbessert. Edmond-Karps benutzt eine Breitensuche, um den Pfad mit den wenigsten Knoten von der Quelle zur Senke zu finden. Dadurch lässt sich die Laufzeit auf $O(|V| \cdot |E|^2)$ verbessern [CLRS09, S.727ff.]. Auch der Algorithmus von Dinic¹ sucht nach kürzesten Pfaden im Restwertgraphen. Zusätzlich wird das Konzept von sogenannten *blockierenden Flüssen* benutzt, bei denen jeder s - t -Pfad mindestens eine Kante enthält, deren Kapazität komplett ausgereizt ist. Der Algorithmus von Dinic benötigt nur $O(|V|^2 \cdot |E|)$ Rechenschritte [Din06].

Die nächste Klasse von Algorithmen waren die sogenannten *Push-Relabel-Algorithmen*. Diese benutzen bei ihren Schritten statt Flüssen nur sogenannte *Präflüsse*, bei denen zwar die Kapazitätsbeschränkung gilt, die Flusserhaltung aber nicht. Das heißt, dass jeder Knoten einen positiven *Überfluss* haben kann, wenn mehr in ihn hinein als hinaus fließt. Jeder Knoten hat einen Index, der seine Höhe im Netz angibt, wobei Fluss immer nur von oben nach unten geleitet werden kann. Wie der Name schon sagt, sind die zwei Grundschritte bei allen Push-Relabel-Algorithmen die Methoden Push und Relabel. Bei Push verschieben wir den *Überfluss* eines Knotens zu einem tiefer gelegenen Nachbarn. Bei Relabel wird hingegen die Höhe eines Knotens vergrößert, wenn er noch *Überfluss* hat, aber alle benachbarten Knoten einen größeren Index haben. Die Push- und Relabelmethoden werden solange angewendet, bis es keine Knoten mehr gibt, auf die sie anwendbar sind [CLRS09, S.736ff.]. Je nachdem, wie der nächste zu bearbeitende Knoten ausgewählt wird, kann die Laufzeit stark variieren. Ein generischer Algorithmus, der die Knoten mehr oder minder zufällig auswählt, benötigt $O(|V|^2 \cdot |E|)$ Rechenschritte. Mit einer FIFO-Warteschlange, in die jeder bearbeitete Knoten, der noch *Überfluss* hat, wieder ans Ende eingereiht wird, lässt sich die Laufzeit auf $O(|V|^3)$ verbessern [GT88]. Der in der Praxis verbreitetste Ansatz benutzt die *Highest-Label*-Regel, bei der alle Knoten in Töpfen nach ihrem Index eingeordnet sind und jeweils ein Knoten mit maximalem Index ausgewählt wird. Hier verbessert sich die Laufzeit auf $O(|V|^2 \cdot \sqrt{|E|})$ Rechenschritte im schlimmsten Fall [AKM097].

Weiter verbessern ließ sich die asymptotische Laufzeit durch die Verwendung von *dynamischen Bäumen*. Dynamische Bäume sind eine Datenstruktur, die die nicht-saturierten Teile von augmentierenden Pfaden speichern. Mit Operationen auf dieser Datenstruktur ist es möglich die Laufzeit zu senken. Beschränkt man beispielsweise die maximale Baumgröße und benutzt eine weitere Datenstruktur, dann lässt sich der maximale Fluss mit Hilfe von blockierenden Flüssen in $O(|V| \cdot |E| \cdot \log(|V|^2/|E|))$ berechnen [GT14]. In der Praxis sind diese Algorithmen aber nicht von Relevanz, weil die verwendete Baumstruktur einen großen konstanten Vorfaktor benötigt. Einer der schnellsten bekannten Algorithmen ist der von Orlin. Er verwendet eine Kombination verschiedener Techniken in unterschiedlichen Situationen und kommt insgesamt auf eine Laufzeit von $O(|V| \cdot |E|)$ [GT14].

4.1.3. Schnitte und der *Max-Flow-Min-Cut-Satz*

Nachdem wir jetzt wissen, wie maximale Flüsse berechnet werden, lernen wir ihren Zusammenhang mit minimalen Schnitten kennen. Diese benötigen wir zum Auflösen von Inkonsistenzen im Inzidenzgraphen.

¹Eigentlich entwickelt vom sowjetischen Forscher Yefim A. Dinits. Die verbreitete Schreibweise beruht auf einem Übersetzungsfehler. Später wanderte Dinits nach Israel aus [Din06].

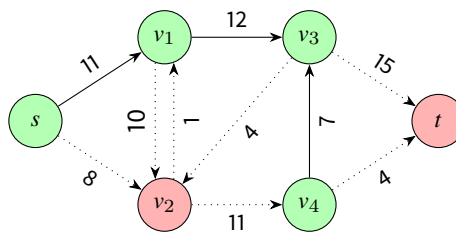
4.1.4 Definition (Schnitt[CLRS09, S.720])

Sei $G = (V, E)$ mit Senke und Quelle $s, t \in V$ und einer Kapazitätsfunktion c . Dann ist ein Schnitt von G eine Partitionierung von V in zwei Mengen A und B , sodass $s \in A$ und $t \in B$ gelten.

Die Kapazität $c_{A,B}$ dieses Schnitts ist definiert als die Summe der Kapazitäten aller Kanten von A nach B :

$$c_{A,B} := \sum_{(v,w) \in E \cap (A \times B)} c(v,w) \quad (4.2)$$

Betrachten wir ein Beispiel für einen Schnitt auf einem Flussnetzwerk. Alle Knoten in A wurden grün und alle in B rot markiert. Kanten zwischen den beiden Mengen wurden gepunktet dargestellt.



Es gilt $A = \{s, v_1, v_3, v_4\}$ und $B = \{v_2, t\}$. Zur Kapazität des Schnitts tragen alle Kanten bei, die von Knoten aus A zu solchen aus B verlaufen. Die Kapazität der Kante (v_3, v_2) wird also gezählt, die der Kante (v_2, v_4) aber nicht. Insgesamt beträgt die Kapazität des Schnitts $c(s, v_2) + c(v_1, v_2) + c(v_3, v_2) + c(v_3, t) + c(v_4, t) = 8 + 10 + 4 + 15 + 4 = 41$.

4.1.5 Definition (Minimaler Schnitt[CLRS09, S.721])

Als *minimalen Schnitt* bezeichnet man einen Schnitt mit minimaler Kapazität. Es kann mehrere solcher *minimalen Schnitte* geben.

Es fällt Asymmetrie zwischen Flüssen, die maximal sein können und Schnitten, die minimal sein können, auf. Der Zusammenhang der beiden Konzepte wird ich im Folgenden kurz beschrieben. Dazu werden wir zwei formale Aussagen betrachten, die hier aber nicht bewiesen werden. Diese sind zwar für unseren Algorithmus von Bedeutung, aber für einen formalen Beweis bräuchten wir einen größeren theoretischen Hintergrund, der obgleich furchtbar spannend, hier den Rahmen sprengte und wenig zielführend wäre.

4.1.6 Lemma ([CLRS09, S.723])

Der Wert eines beliebigen Flusses über einem Flussnetzwerk ist beschränkt durch einen beliebigen Schnitt.

Beweis. Siehe [CLRS09, S.723]. □

4.1.7 Satz (Max-Flow-Min-Cut-Satz[CLRS09, S.723])

Für ein Flussnetzwerk $G = (V, E)$ mit Senke $s \in V$ und Quelle $t \in V$ entspricht die minimale Kapazität aller Schnitte auf G dem maximalen Wert aller Flüsse von s nach t .

4. Ein Min-Cut-Ansatz für das Konsistenzproblem

Beweis. Der kurz vorgestellte Algorithmus von Ford-Fulkerson sucht solange augmentierende Pfade mit positiver Restwertkapazität von der Quelle zur Senke, bis es keinen solchen mehr gibt. Sobald das der Fall ist, hatte man den maximalen Fluss berechnet. Das bedeutet gleichzeitig, dass man den Bottleneck zwischen s und t gefunden hat. Genau dieser trennt die Knoten von G in zwei Hälften und ist unser minimaler Schnitt. Für einen formalen Beweis neben dieser Skizze siehe auch hier [CLRS09, S.723f.]. \square

Der Max-Flow-Min-Cut-Satz zeigt, dass Algorithmen zur Berechnung des maximalen Flusses benutzt werden können, um einen minimalen Schnitt eines Flussnetzwerkes zu bestimmen. Das werden wir im nächsten Abschnitt ausnutzen, um Inkonsistenzen zwischen unseren Sequenzen aufzulösen, indem wir durch minimale Schnitte die zu löschenden Kanten bestimmen.

4.2. Inzidenzgraphen und das Auflösen von Inkonsistenzen mit Hilfe von Flussnetzwerken

4.2.1. Konstruieren des Inzidenzgraphen

Wir starten wie bei DIALIGN zunächst mit paarweisen Alignments. Unser Ziel ist es Übereinstimmungen zu finden, die in möglichst vielen Sequenzen gleichzeitig vorkommen. Das ist ein vielversprechender Ansatz, weil die gesuchten Motive oft in vielen sich überlappenden Fragmente vorkommen, während Überlappungen bei zufälligen Übereinstimmungen unwahrscheinlich sind. Dazu konstruieren wir einen sogenannten Inzidenzgraphen, der alle Stellen als Knoten enthält, die durch Kanten verbunden sind, falls es ein sie verbindendes Fragment gibt. Mit Hilfe eines Algorithmus zur Berechnung des maximalen Flusses bestimmen wir minimale Schnitte, bis nur noch dichte Zusammenhangskomponenten übrig bleiben, die jeweils höchstens einen Knoten aus jeder Sequenz enthalten [CPM10].

4.2.1 Definition (Mehrdeutigkeit und partielle Zuweisungsspalten[CPM10])

Es sei eine Menge an Sequenzen S mit Stellenraum \mathcal{S} gegeben. Eine Teilmenge $C \subset \mathcal{S}$ nennen wir *mehrdeutig*, wenn es mindestens eine Sequenz S_i gibt, sodass $C \cap S_i$ zwei oder mehr Stellen $(i, p), (i, p') \in \mathcal{S}$ enthält. In diesem Fall nennen wir auch (i, p) und (i, p') *mehrdeutig*.

Analog nennen wir eine Äquivalenzrelation \mathcal{R} *mehrdeutig*, wenn \mathcal{R} eine mehrdeutige Äquivalenzklasse enthält.

Eine *nicht-mehrdeutige* Teilmenge $C \subset \mathcal{S}$ bezeichnen wir als *partielle Zuweisungsspalte*.

Es lässt sich folgern, dass eine konsistente Äquivalenzrelation auch nicht mehrdeutig ist. Aus fehlender Mehrdeutigkeit folgt aber im Allgemeinen keine Konsistenz. Das liegt daran, dass es überkreuzte Zuweisungen geben kann, die aber partielle Zuweisungsspalten sind. Nicht-mehrdeutige Äquivalenzrelationen bestehen nur aus partiellen Zuweisungsspalten.

Im Folgenden sei eine Menge von Fragmenten $\mathcal{F} = \{f_1, \dots, f_k\}$ gegeben. Normalerweise werden dies die Fragmente unserer paarweisen Alignments sein, aber theoretisch kann man auch anders bestimmte benutzen. Wir wollen möglichst wenige Verbindungen aus der durch die Fragmente induzierte Relation \mathcal{R} löschen, bis eine nicht-mehrdeutige Äquivalenzrelation \mathcal{R}' bleibt.

4.2. Inzidenzgraphen und das Auflösen von Inkonsistenzen mit Hilfe von Flussnetzwerken

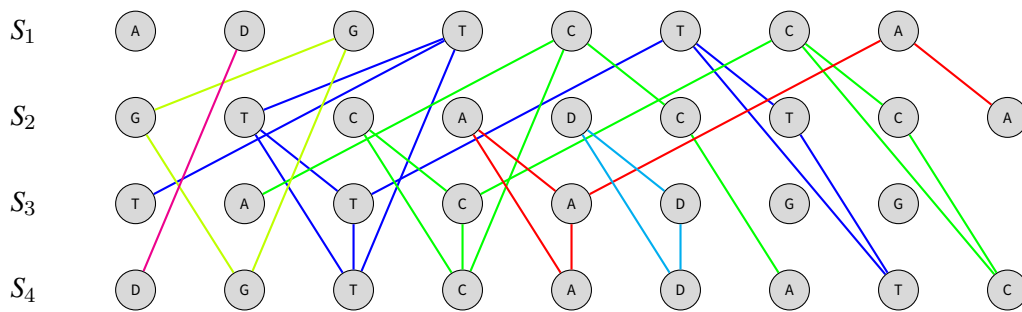


Abbildung 4.3.: Inzidenzgraph für die vier Beispielsequenzen.

4.2.2 Definition (Inzidenzgraph[CPM10])

Es sei ein Stellenraum S mit einer Menge von Fragmenten \mathcal{F} auf diesem gegeben. Dann bezeichnen wir den ungerichteten Graphen $G_{\mathcal{F}} = (S, E_{\mathcal{F}})$ als Inzidenzgraphen. In diesem Graph existiert genau dann eine Kante $(u, v) \in E_{\mathcal{F}}$, wenn die Stellen u und v in einem gemeinsamen Fragment $f_i \in \mathcal{F}$ vorkommen.

Wie man sieht, sind die Zusammenhangskomponenten unseres Inzidenzgraphen genau die Äquivalenzklassen der durch \mathcal{F} induzierten Kanten. Weil diese nicht weiter nützlich sind, kann man Stellen, die nicht mit anderen verbunden sind, von vornherein ignorieren beziehungsweise löschen, wenn sie nach dem Entfernen von Kanten Grad 0 haben. So lässt sich etwas Speicherplatz sparen und die Ergebnisse dieses Algorithmus können direkt für den nächsten Schritt weiterverwendet werden. Um die Positionierung der Zusammenhangskomponenten im Inzidenzgraphen zu verdeutlichen, lassen wir sie in unseren graphischen Beispielen im nächsten Abschnitt aber stehen.

4.2.2. Beispiel Inzidenzgraph

Auch hier werden wir wieder unser Beispiel aus dem letzten Kapitel benutzen. Erinnern wir uns zunächst an die Fragmente der paarweisen Alignments. Die Überlappgewichte brauchen wir für diesen Schritt des Algorithmus nicht, weil wir versuchen, mit Hilfe von minimalen Schnitten ein ähnliches aber besseres Ergebnis zu erreichen.

Seq.	Frag.	Ü-Gew.	Seq.	Frag.	Ü-Gew.	Seq.	Frag.	Ü-Gew.
2	GTCADCTC	16	1	TCTCA	7	1	GT	2
4	GTCADATC		3	TATCA		2	GT	
3	TCAD	8	1	CTCA	8	1	TC	2
4	TCAD		2	CTCA		4	TC	
2	TCAD	8	1	DGTC	8			
3	TCAD		4	DGTC				

Diese Fragmente überführen wir direkt in den Inzidenzgraphen 4.3, bei dem die Stellen als Knoten und die Verbindungen in gemeinsamen Fragmenten als Kanten übertragen werden. Um die Übersichtlichkeit halbwegs zu wahren, wurden die Kanten jeder Zusammenhangskomponente jeweils in einer Farbe markiert.

4.2.3. Auflösen von Mehrdeutigkeiten

Die Zusammenhangskomponenten unseres Inzidenzgraphen werden wir jetzt als Flussnetzwerke interpretieren, um mit Hilfe eines Algorithmus zur Berechnung eines minimalen Schnitts solange Kanten zu entfernen, bis alle Mehrdeutigkeiten aufgelöst sind.

Sei C eine Zusammenhangskomponente von $G_{\mathcal{F}}$, die mehrdeutig ist, also zwei Knoten x, y aus der selben Sequenz enthält. Wir wählen die mehrdeutigen Knoten x und y als Quelle und Senke unseres Flussnetzwerks. Die ungerichteten Kanten des Inzidenzgraphen werden durch zwei antiparallele gerichtete Kanten ersetzt. [CPM10] benutzen als Kapazitäten jeweils 1. Meiner Meinung nach wäre es hingegen sinnvoller die Kapazitäten so zu wählen, dass ähnliche Symbole seltener voneinander durch den minimalen Schnitt und das damit einhergehende Löschen von Kanten getrennt werden. Wir wollen ja ein möglichst gutes Alignment erhalten und für dieses haben Verbindungen zwischen gleichen Symbolen einen höheren Wert, als solche zwischen verschiedenen Symbolen.

Das können wir beispielsweise erreichen, indem wir uns an den Ähnlichkeitswerten unserer Substitutionsmatrix orientieren. Weil Flussnetzwerke nicht-negative Kapazitäten erwarten, müssen die Werte gegebenenfalls modifiziert werden, indem wir den betragsmäßig größten Eintrag der Matrix zu allen Einträgen addieren. Das bedeutet, dass bei unserer $(+3/-1)$ -Substitutionsmatrix aus dem Beispiel zwischen übereinstimmenden Symbolen eine Kapazität von 6 und zwischen nicht übereinstimmenden eine von 2 benutzt wird. Leider war es aufgrund der begrenzten Zeit und des hohen Aufwands nicht möglich das ganze Verfahren zu implementieren. Eine Evaluierung mit echten Alignments fehlt also. Weil der Ansatz mit den nicht-einheitlichen Kapazitäten aber vielversprechend erscheint, wurde er in den weiteren Beispielen verwendet.



Abbildung 4.4.:

Zwei Zusammenhangskomponenten des Inzidenzgraphen der Datensätze BB12001 (links) und BB50005 (rechts)

[CPM10]. Wie man sieht, bestehen diese aus dichten Subgraphen, die nur durch wenige Kanten verbunden sind.

Ziel des Algorithmus 5 ist es genau diese Kanten zu entfernen.

Als nächstes benutzen wir einen Algorithmus zur Bestimmung des maximalen Flusses. Wie mit dem Max-Flow-Min-Cut-Satz gezeigt, bestimmen wir durch die Bestimmung des maximalen Flusses auch gleichzeitig einen minimalen Schnitt. Das ist die „schmalste“ Verbindungsstelle zwischen der Quelle und der Senke und wir hoffen durch Löschen der dazugehörigen Kanten die Mehrdeutigkeit aufzulösen und die dicht besetzten Untergraphen zu erhalten. Im Original wird der Algorithmus von Edmonds-Karp benutzt, während wir stattdessen einen Push-Relabel-Algorithmus mit Laufzeit $O(|V|^2 \cdot \sqrt{|E|})$ für die Komplexität betrachten und in unserer Implementierung verwendet hätten. Nachdem der minimale Schnitt bestimmt wurde, löschen wir alle Kanten zwischen den Mengen A und B . Auf diese Art und Weise wird unsere Zusammenhangskomponente C in zwei neue Zusammenhangskomponenten A und B aufgeteilt. Dieses Verfahren wiederholen wir solange, bis es keine mehrdeutigen Äquivalenzklassen mehr gibt.

Algorithmus 5 Algorithmus zum Auflösen von Mehrdeutigkeiten in einem Inzidenzgraphen

Require: Inzidenzgraph $G_{\mathcal{F}} = (S, E_{\mathcal{F}})$ über einem Satz Fragmente \mathcal{F}

```

1: procedure RESOLVEAMBIGUITIES( $G_{\mathcal{F}}$ )
2:    $E \leftarrow E_{\mathcal{F}}$ 
3:   Berechne Zusammenhangskomponenten von  $G_{\mathcal{F}}$ 
4:   while es ex. mehrdeutige Zusammenhangskomponente  $C$  von  $G_{\mathcal{F}}$  do
5:     while es ex. mehrdeutige Knoten  $x, y$  aus der selben Sequenz do
6:       Wähle Sequenz  $S_i$  mit max. Anzahl an mehrdeutigen Knoten in  $C$ 
7:       Wähle  $s = \operatorname{argmin}\{\deg(v) \mid v \in C \text{ und } v \in S_i\}$ 
8:       Wähle  $t = \operatorname{argmax}\{\deg(v) \mid v \in C \text{ und } v \in S_i\}$ 
9:       Definiere Flussnetzwerk auf  $C$  mit Quelle  $s$  und Senke  $t$ 
10:      Benutze PushRelabel, um minimalen Schnitt  $C_1$  und  $C_2$  zu bestimmen
11:      Lösche Kanten zwischen  $C_1$  und  $C_2$  aus  $E$ 
12:    end while
13:  end while
14:  return nicht-mehrdeutigen Subgraphen  $(S, E)$  von  $G_{\mathcal{F}}$ 
15: end procedure

```

Unglücklicherweise können die Zusammenhangskomponenten bei Alignments zwischen vielen langen Sequenzen sehr groß werden. [CPM10] haben daher eine Grenze $k = \max\{\deg(v) \mid v \in S\}$ eingeführt, die sukzessive gesenkt wird, bis alle Mehrdeutigkeiten aufgelöst wurden. k wird so benutzt, dass alle Kanten zwischen Knoten mit Grad $< k$ zunächst nicht betrachtet werden, sodass andere kleinere Zusammenhangskomponenten vorliegen. Als erstes werden für den reduzierten Kantensatz $E_k = \{(u, v) \in E \mid \min\{\deg(u), \deg(v)\}\}$ solange minimale Schnitte berechnet und Kanten gelöscht, bis für den Graph mit weniger Kanten keine mehrdeutigen Zusammenhangskomponenten mehr existierten. Danach wird k um eins reduziert und das Vorgehen auf dem neuen Kantensatz wiederholt. Sobald k auf 0 gesetzt wurde, hat man alle Knoten betrachtet und es liegen nur noch partielle Zuweisungsspalten vor.

Bis jetzt wurde nur festgelegt, dass wir mehrdeutige Zusammenhangskomponenten auswählen und für diese jeweils einen Knoten aus derselben Sequenz als Quelle und Senke wählen. Es fehlt allerdings noch eine Regel, in welcher Reihenfolge diese gewählt werden. Für die Zusammenhangskomponenten benötigen wir keine feste Reihenfolge, weil diese unabhängig voneinander sind.

Sei eine mehrdeutige Zusammenhangskomponente C gegeben. Dann mag es mehrere Sequenzen geben, die alle zu mehr als einem Knoten in C korrespondieren. Außerdem muss es nicht unbedingt einen eindeutigen minimalen Schnitt geben. Wir entscheiden uns für dieses Vorgehen:

1. Falls es mehrere Sequenzen gibt, die zwei oder mehr mehrdeutige Stellen in C enthalten, wähle die Sequenz S_i mit den meisten mehrdeutigen Knoten in dieser Zusammenhangskomponente.
2. Sobald S_i bestimmt ist, wähle unter allen Stellen aus dieser Sequenz in C den Knoten mit dem niedrigsten Knotengrad als Quelle und den mit dem höchsten als Senke.
3. Sollte es mehr als einen minimalen Schnitt geben, dann orientieren wir uns an dem Ergebnis des Algorithmus der Implementierung und wählen die Partitionierung, die sich durch die nur durch Kanten mit Restwertkapazität 0 verbundenen Subgraphen

Algorithmus für diesen Abschnitt anpassen und im Text auf Algorithmus verweisen.

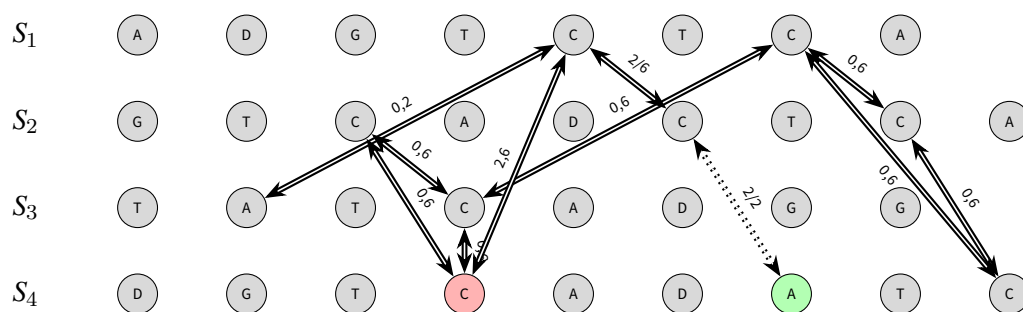
4. Ein Min-Cut-Ansatz für das Konsistenzproblem

im Restwertgraphen ergibt.

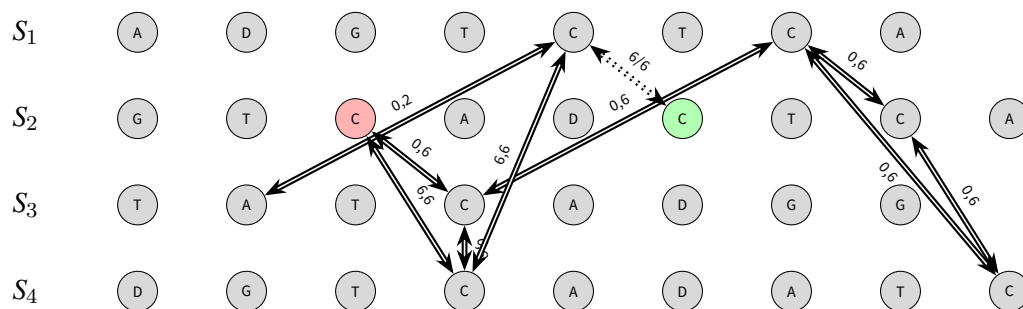
4.2.4. Beispiel von ResolveAmbiguities

Exemplarisch betrachten wir die grüne Zusammenhangskomponente, weil diese die meisten Knoten enthält, und werden an ihrem Beispiel solange den minimalen Schnitt durchführen, bis keine Inkonsistenzen mehr vorliegen. Die Quelle ist grün, während die Senke rot dargestellt ist.

Beim ersten Schritt haben sowohl S_2 , als auch S_4 drei Knoten in C . Wir wählen $S_4[7]$ als Quelle und $S_4[4]$ als Senke, weil diese den kleinsten bzw. größten Knotengrad haben. In diesem Fall passiert nichts Spannendes, weil der minimale Schnitt aufgrund der Kante mit Kapazität 2 direkt die Quelle vom Rest der Zusammenhangskomponente trennt (gestrichelte Kante).

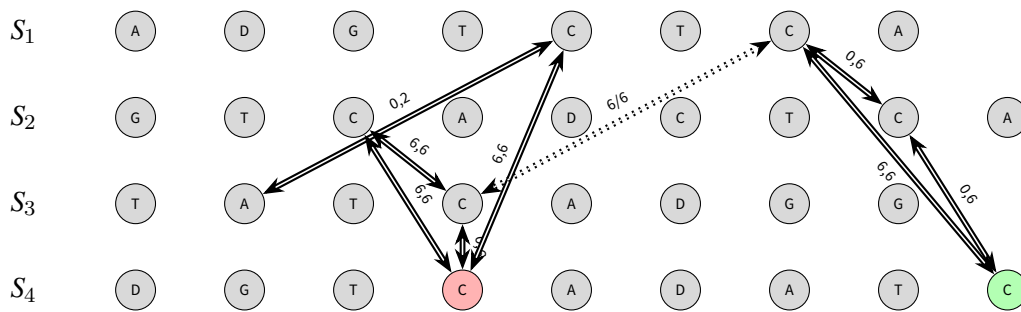


Im nächsten Schritt hat S_2 mit drei Knoten die meisten Knoten in C . Da sowohl $S_2[3]$ als auch $S_2[8]$ Knotengrad 2 haben, gibt es keine Regel, welchen der beiden wir als Senke wählen. Wir entscheiden uns für $S_2[6]$ als Quelle und $S_2[8]$ als Senke. Auch hier wird direkt die erste Kante an der Quelle gelöscht.



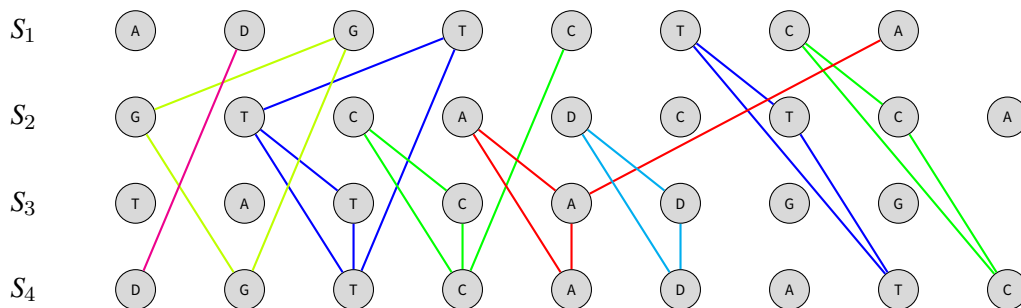
Da es wieder mehrere Sequenzen mit zwei mehrdeutigen Knoten in C gibt, entscheiden wir uns für Sequenz S_4 . Wir wählen $S_4[9]$ als Quelle und $S_4[4]$ als Senke. Hier liegen zwei relativ dichte Subgraphen vor, die nur durch die eine Kante ($S_1[7] \rightarrow S_3[4]$) miteinander verbunden sind. Diese löschen wir und danach gibt es in der rechten Zusammenhangskomponente keine Mehrdeutigkeiten mehr.

4.2. Inzidenzgraphen und das Auflösen von Inkonsistenzen mit Hilfe von Flussnetzwerken



Abschließend wird die Verbindung zwischen dem A aus der zweiten Sequenz und dem C an der fünften Stelle der ersten gelöscht, was hier nicht mehr graphisch dargestellt wurde. Danach sind alle Mehrdeutigkeiten aufgelöst und es liegen nur noch partielle Zuweisungsspalten vor.

Wenn wir den Algorithmus auch auf allen anderen Zusammenhangskomponenten anwenden, dann kommen wir zu folgendem Inzidenzgraphen ohne Mehrdeutigkeiten:



Obwohl in diesem Graphen keine Mehrdeutigkeiten mehr existieren, ist die Zuordnung noch nicht konsistent. Das liegt an Überkreuzungen, wie der zwischen $(S_1[8] \rightarrow S_3[5] \rightarrow S_4[5])$ (rot) und $(S_1[7] \rightarrow S_4[9])$ (grün).

4.2.5. Komplexität

Der Inzidenzgraph lässt sich aus den Fragmenten der paarweisen Alignments in $O(n^2 \cdot L)$ berechnen, weil es $O(n^2)$ Paare gibt, die bis zu $O(L)$ Verbindungen enthalten.

Die Laufzeit von `ResolveAmbiguities` wird von der Laufzeit zur Berechnung des minimalen Schnitt durch `PushRelabel` dominiert [CPM10]. Diese hängt von der Größe unserer Zusammenhangskomponenten ab. Im schlimmsten Fall besteht der Inzidenzgraph aus einer einzigen Zusammenhangskomponente, bei der jeder Knoten mit mindestens einem Knoten aus jeder anderen Sequenz verbunden ist. In diesem Fall muss sie in vielen Schritten zerkleinert werden, bis nur noch partielle Zuweisungsspalten übrig bleiben. Eine Zusammenhangskomponente kann $n \cdot L$ Knoten und $O(n^2 \cdot L)$ Kanten haben. Das liegt daran, dass wir als Grundlage unsere paarweisen Alignments benutzen, bei denen jede Stelle für jede andere Sequenz mit höchstens einer Stelle aus dieser verbunden ist.

PushRelabel hat eine Komplexität von $O(|V|^2 \cdot \sqrt{|E|})$, um einen minimalen Schnitt zu berechnen. Weil $|V| \in O(n \cdot L)$ und $|E| \in O(n^2 \cdot L)$ gelten, braucht man für einen Durchlauf also $O(n^3 \cdot L^{5/2})$. Im schlimmsten Fall entfernt jeder Aufruf unseres Algorithmus für den maximalen Fluss nur einen einzigen Knoten aus der Zusammenhangskomponente. Das resultiert in $n \cdot L$ Aufrufen und einer Gesamtlaufzeit von $O(n^4 \cdot L^{7/2})$. Die Kosten für

4. Ein Min-Cut-Ansatz für das Konsistenzproblem

das Bestimmen der Zusammenhangskomponenten, das Finden der Quellen und Senken und das Löschen von Kanten liegen jeweils in linearer Größe zur Größe des Graphen und werden daher hier nicht weiter betrachtet. Für ersteres benutzt man beispielsweise eine Tiefensuche, für das zweite eine Breitensuche und letzteres wird per Iteration über alle Kanten gelöst.

Möglicherweise lässt sich eine bessere Laufzeit erreichen, wenn alle Kanten eine uniforme Kapazität haben, wie das bei der Variante der Autoren der Fall ist. Es lässt sich zeigen, dass das ein deutlich leichteres Problem ist [GT14] und nach Karzanov und Even hat eine Variante des Algorithmus von Dinic in diesem Fall gute Laufzeiten.

Glücklicherweise sind die Zusammenhangskomponenten im Allgemeinen nicht so groß und in den meisten Fällen trennt man mit dem minimalen Schnitt auch nicht nur einzelne Knoten ab. Bei Testläufen auf der Protein-Referenzdatenbank BALiBASE haben [CPM10] die Referenzmenge RV12 genauer betrachtet. Sie besteht aus 88 Sequenzfamilien, die im Schnitt zehn Sequenzen enthielten. Messungen haben ergeben, dass die Inzidenzgraphen auf diesen Sequenzfamilien im Schnitt 2877 Knoten und 10952 Kanten in 223 Zusammenhangskomponenten enthalten haben. Auf diesen Sequenzen lassen sich in guten Laufzeiten von weniger als einer Minute multiple Sequenzalignments berechnen. Anders sah es auf der Sequenzfamilie BB30003 aus. Diese besteht aus 142 Sequenzen und resultiert in einem sehr großen und dichten Inzidenzgraphen, der nur aus einer einzigen Zusammenhangskomponente besteht. Nach einer Laufzeit von 20 Stunden ohne Ergebnis wurde der Lauf auf dem Graphen, der $1,5 \cdot 10^6$ Kanten enthält, erfolglos abgebrochen. Erst mit einer Begrenzung des minimalen Fragmentgewichts auf 4 ließ sich in 13 Stunden ein Ergebnis erzielen.

4.3. Sukzessionsgraphen und der Algorithmus von Pitschi

4.3.1. Aufbau des Sukzessionsgraphen

Wie wir gesehen haben, ist die Menge an Zuweisungen nach dem `ResolveAmbiguities`-Aufruf noch nicht konsistent, aber es liegen keine Mehrdeutigkeiten mehr vor. Das zwingt uns dazu weitere Verbindungen aus der Äquivalenzrelation zu löschen, bis diese ein Alignment, also konsistent ist. Wir führen dazu eine Datenstruktur ein, die die Zusammenhangskomponenten des reduzierten Inzidenzgraphen nach ihrer Ordnung in den beteiligten Sequenzen ordnet.

Es sei eine Menge an Sequenzen S mit Stellenraum S gegeben. Für diese Sequenzen liegt eine Menge C von Zusammenhangskomponenten vor, die alle partielle Zuweisungsspalten sind. Wir definieren einen Graphen $SG(C) = (C, E)$ als gerichteten, gewichteten Graphen. In $SG(C)$ fügen wir genau dann eine Kante $e = (C, C')$ für $C, C' \in C$ ein, wenn eine Sequenz $S_i \in S$ existiert, für die Stellen $s = (i, p) \in C$ und $s' = (i, p') \in C'$ vorliegen mit $p < p'$ und außerdem keine Stelle $s = (i, p'')$ in einem anderen Knoten C'' mit $p < p'' < p'$ vorhanden ist. Das Gewicht von e ist die Anzahl an Sequenzen für die die obige Bedingung gilt. Des Weiteren setzen wir voraus, dass alle Zusammenhangskomponenten mindestens zwei Knoten enthalten. Außerdem fügen wir zwei zusätzliche Knoten v_{start} und v_{end} ein. v_{start} ist mit allen Knoten verbunden, die die erste Stelle einer Sequenz enthalten. Zusätzlich sind alle Knoten, die die letzte Stelle einer Sequenz enthalten mit v_{end} über eine Kante verbunden.

4.3. Sukzessionsgraphen und der Algorithmus von Pitschi

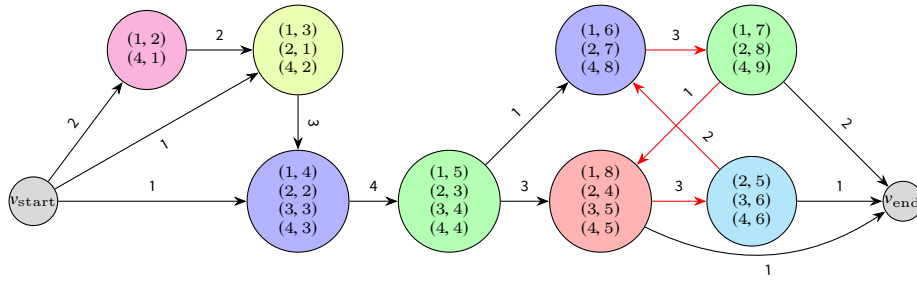


Abbildung 4.5.: Sukzessionsgraph der Beispielsequenzen. Wegen des rot hervorgehobenen Zyklus ist die gegenwärtige Relation nicht konsistent.

4.3.1 Definition (Sukzessionsgraph[CPM10])

Den soeben konstruierten Graphen $SG(C)$ bezeichnen wir als *Sukzessionsgraphen*.

Wie man sieht sind zwei Knoten C und C' aus dem Sukzessionsgraphen genau dann miteinander verbunden, wenn es in diesen Stellen aus der selben Sequenz gibt, bei denen die aus C links von der in C' stehen. Die zusätzlich eingefügten Knoten v_{start} und v_{end} brauchen wir im Algorithmus von Pitschi, um die Konnektivität des Graphen zu erhalten, wenn wir Kanten aus dem Graph löschen. Das werden wir später tun, um Inkonsistenzen zu entfernen. Setzen wir nicht voraus, dass die Knoten von SG mindestens zwei Stellen enthalten, dann liefert der Algorithmus von Pitschi suboptimale Ergebnisse, wie wir später sehen werden. [CPM10] und [PDC10] sind an dieser Stelle nicht eindeutig.

Als Beispiel konstruieren wir aus dem reduzierten Inzidenzgraphen des letzten Schritts einen Sukzessionsgraphen in Abbildung 4.5. Die Knotenfarben wurden in der Farbe der Zusammenhangskomponenten des Inzidenzgraphen aus dem letzten Schritt gewählt.

4.3.2 Lemma ([PDC10])

Die Menge C ist genau dann konsistent, wenn $SG(C)$ ein gerichteter, azyklischer Graph (DAG) ist.

Beweis. „ \Rightarrow “: Sei C eine konsistente Menge von Zusammenhangskomponenten mit der induzierten Äquivalenzrelation \mathcal{R} . Dann folgt aus $x \leq_{\mathcal{R}} y$ auch $x \leq y$ für alle Sequenzen. Angenommen, es gibt in $SG(C)$ einen Zyklus. Dann gibt es Knoten C, C' mit Stellen $s_1, s_2 \in C$ und $s'_1, s'_2 \in C'$ mit folgenden Eigenschaften:

1. $s_1, s'_1 \in S_1$ und $s_2, s'_2 \in S_2$
2. $\text{pos}(s_1) < \text{pos}(s'_1)$ und $\text{pos}(s'_2) < \text{pos}(s_2)$

Diese muss es geben, sonst gäbe es keinen Zyklus im Graphen. Für diese Stellen gelten $s'_1 \mathcal{R} s'_2, s'_2 \leq s_2$ und $s_2 \mathcal{R} s_1$, woraus $s'_1 \leq_{\mathcal{R}} s_1$ folgt. Es gilt aufgrund von $\text{pos}(s_1) < \text{pos}(s'_1)$, weshalb $s_1 \not\leq s'_1$ folgt. Das steht im Widerspruch dazu, dass C konsistent ist.

„ \Leftarrow “: Wir benutzen einen Kontrapositionsbeweis. Dafür sei eine inkonsistente Menge C gegeben. Dann existiert eine Sequenz S_1 , die Stellen $s_1, s'_1 \in S_1$ mit folgenden Eigenschaften enthält:

1. $s_1 \leq_{\mathcal{R}} s'_1$
2. $s_1 \not\leq s'_1$

Aus $s_1 \leq_{\mathcal{R}} s'_1$ folgt, dass es zwei Knoten C und C' gibt mit $s_1 \in C$ und $s'_1 \in C'$, die in $SG(C)$ über einen Pfad verbunden sind. Der Pfad kann aber nicht über eine Kante laufen, die zu

4. Ein Min-Cut-Ansatz für das Konsistenzproblem

S_1 gehört, denn $s_1 \not\leq s'_1$ gilt. Aus dieser Bedingung folgt aber, dass einen Pfad von C' zu C' geben muss. Da es sowohl von C nach C' , als auch von C' nach C Pfade gibt, kann $SG(C)$ nicht azyklisch sein. \square

4.3.2. Der Algorithmus von Pitschi

Aufgrund des gerade gezeigten Lemmas folgt, dass wir eine konsistente Menge von partiellen Zuweisungsspalten finden, wenn deren Sukzessionsgraph azyklisch ist. Der Algorithmus von [PDC10] sieht zwei Schritte vor, um aus dem potentiell zyklischen Sukzessionsgraphen einen azyklischen Graphen zu konstruieren, der mit einer konsistenten Menge von partiellen Zuweisungsspalten korrespondiert:

1. Lösche Kanten aus dem Sukzessionsgraphen, bis dieser kreisfrei ist.
2. Benutze den so entstandenen DAG, um zu entscheiden, welche Stellen aus den jeweiligen Knoten gelöscht werden müssen, um Inkonsistenzen zu entfernen.

Entfernen der Kanten

Wir beginnen mit der Transformation des zyklischen Graphen in einen azyklischen Sukzessionsgraphen, indem wir Kanten entfernen. Optimal wäre es, Kanten mit einer minimalen Summe von Kantengewichten zu entfernen. Dieses Problem, das auch als „minimal weighted feedback arc set“-Problem bekannt ist, NP-schwer. Als Folge bedienen wir uns einer einfachen Heuristik, indem wir sukzessive eine Grenze k erhöhen und in jedem Schritt alle Kanten mit einem Gewicht kleiner als k löschen, bis es keinen Zyklus im Graphen mehr gibt. Formal definieren wir die Menge an Kanten, die mindestens das Gewicht $k \in \mathbb{N}$ hat als

$$\begin{aligned} E_k &:= \{(u, v) \in E \mid w(u, v) > k \text{ oder } u = v_{\text{start}} \text{ oder } v = v_{\text{end}}\} \text{ mit} \\ k^* &:= \min\{k > 0 \mid (V, E_k) \text{ ist azyklisch}\} \end{aligned} \quad (4.3)$$

Für den Fall, dass der Graph durch das Löschen von Kanten nicht mehr zusammenhängend ist, fügen wir für jede Zusammenhangskomponente und jede an dieser beteiligten Sequenz eine Kante vom Startzustand v_{start} zum Knoten mit der kleinsten Stelle aus der gewählten Sequenz ein. Analog gehen wir mit den größten Stellen und dem Endzustand v_{end} vor. Diese Menge dieser Kanten nennen wir E_c . Auf diese Weise ist sichergestellt, dass der azyklische Graph $G^* = (V, E_{k^*} \cup E_c)$ zusammenhängend ist und über jeden Knoten ein Pfad vom Start- zum Endzustand führt.

Beispiel zum Entfernen von Kanten

Bei unserem Beispiel ist glücklicherweise nur ein einziger Zyklus vorhanden, der bereits in (V, E_1) nicht mehr vorhanden ist. Wir löschen also alle Kanten mit Kantengewicht 1 oder weniger, die nicht zum Start- oder Endknoten gehören. Entfernte Kanten wurden in Abbildung 4.6 gestrichelt dargestellt.

Entfernen von Stellen

Als nächstes lernen wir einen von [PDC10] entwickelten Algorithmus kennen, der eine minimale Anzahl an Stellen aus dem verkleinerten Sukzessionsgraphen G^* löscht, um

4.3. Sukzessionsgraphen und der Algorithmus von Pitschi

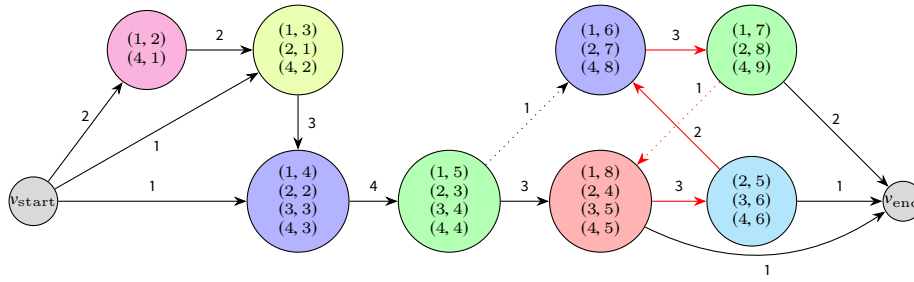


Abbildung 4.6.: Azyklischer Sukzessionsgraph mit reduziertem Kantensatz E_1 .

alle Inkonsistenzen zu entfernen. Dabei orientiert sich der Algorithmus an der linearen Halbordnung \leq über \mathcal{S} und der Halbordnung auf dem DAG, die ersterer angepasst werden soll. Wir bezeichnen die Halbordnung auf \mathcal{C} , die durch den Graph G^* induziert wird, als \leq^* .

Sei eine Sequenz $S_i \in \mathcal{S}$ gegeben. Dann ist C_{S_i} die größtmögliche Teilmenge von Zusammenhangskomponenten aus \mathcal{C} , die Stellen aus S_i enthalten. Wir definieren außerdem eine Beschränkung der Knoten aus G^* von C_{S_i} als $V_{S_i} = C_{S_i} \cup \{v_{\text{start}}, v_{\text{end}}\}$. Auf diesen existiert eine Ordnung \leq_{S_i} , die durch die natürliche Ordnung auf S_i gegeben ist, und die Halbordnung $\leq_{S_i}^*$ des Graphen mit reduzierter Knotenmenge. Wir definieren $\mathcal{R}_{S_i} = \leq_{S_i} \cap \leq_{S_i}^*$. Diese Relation entspricht genau den Verbindungen der transitiven Hülle im ursprünglichen Graph, wenn man G^* auf die Knoten aus C_{S_i} beschränkt. Sei dafür $G^+ = (V, E^+)$ die transitive Hülle $TC(G^*)$ des DAG. Weil G^* keine Zyklen enthält, kann auch $TC(G^*)$ keine enthalten. Wir können G^* auf jede unserer Sequenzen S_i beschränken, indem wir den reduzierten Knotensatz V_{S_i} benutzen und genau dann eine Kante zwischen zwei Knoten einfügen, falls diese in unserer Relation \mathcal{R}_{S_i} liegen.

4.3.3 Definition ([CPM10])

Der Graph G_{S_i} einer Sequenz S_i ist definiert als Graph über der Knotenmenge V_{S_i} und den Kanten E_{S_i} . Es gilt

$$(u, v) \in E_{S_i} \iff u, v \in V_{S_i}, (u, v) \in E^+ \text{ und } u \leq_{S_i} v \iff u \mathcal{R}_{S_i} v \quad (4.4)$$

Pfade von v_{start} nach v_{end} in G_{S_i} sind genau die Teilmengen von partiellen Zuweisungsspalten, die bezüglich S_i konsistent sind. Das liegt daran, dass für zwei Knoten $u, v \in V_{S_i}$ auf einem solchen Pfad sowohl $u \leq_{S_i} v$, als auch $u \leq_{S_i}^* v$ gelten und damit $u \leq_{S_i}^* v \implies u \leq_{S_i} v$. Der Erhalt der natürlichen Ordnung entspricht aber genau der Definition eines Alignments. Wir entfernen daher alle Stellen unserer Sequenz aus den Knoten, die nicht auf dem gewählten Pfad liegen, weil diese die Konsistenz verletzen würden.

Wenn wir jetzt für jede unserer Sequenzen S_j einen Pfad von v_{start} nach v_{end} in G_{S_j} wählen und alle nicht besuchten Stellen aus ihren Knoten entfernen, dann wird die Konsistenzbedingung auf der Relation, die durch die übriggebliebenen Zusammenhangskomponenten induziert wird, erfüllt. Das Resultat ist dementsprechend ein Alignment. Da das Ziel aber nicht die Bestimmung eines beliebigen Alignments ist, sondern eines möglichst großen, wählen wir für jede Sequenz $S_i \in \mathcal{S}$ den Pfad maximaler Länge durch G_{S_i} . Auf diese Weise löschen wir die minimale Anzahl an Stellen aus ihren Zusammenhangskomponenten

4. Ein Min-Cut-Ansatz für das Konsistenzproblem

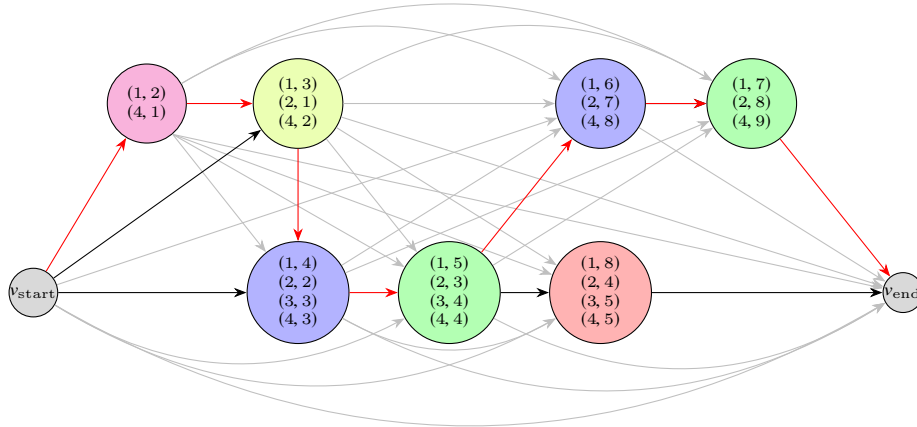


Abbildung 4.7.: Der auf Sequenz 1 eingeschränkte und um die transitive Hülle erweiterte DAG G_{S_1} .

ten. Formal: Sei für eine Sequenz S_i ein Pfad g_{S_i} maximaler Länge $(v_{start}, u_1, \dots, u_n, v_{end})$ gegeben. Wir iterieren über alle Knoten $C \in C_{S_i}$ und entfernen Stellen $(i, p) \in C$, falls $C \notin g_{S_i}$. Wenn wir das für alle Sequenzen tun, dann nennen wir die Menge der reduzierten Zusammenhangskomponenten C° . Weil die mit C° korrespondierende Relation ein Alignment ist, wäre der Sukzessionsgraph $SG(C^\circ)$ ein DAG. Da die Pfade für jede Sequenz unabhängig voneinander sind, können wir diese in beliebiger Reihenfolge wählen, ohne dass dies einen Einfluss auf unser Ergebnis hat.

Letztendlich folgt, dass das Problem, die partiellen Zuweisungsspalten auf konsistente Zuweisungsspalten zu reduzieren, auf die Suche nach Pfaden maximaler Länge durch gerichtete azyklische Graphen abbildbar ist [CPM10].

Beispiel zum Entfernen von Stellen mit dem Algorithmus von Pitschi

Bevor wir im nächsten Abschnitt genauer kennenlernen, wie man einen längsten Pfad im DAG eigentlich genau berechnet, betrachten wir unser Beispiel in Abbildung 4.7, in diesem Fall nur für die Sequenz S_1 . Weil der Algorithmus zum Berechnen des längsten Pfades die Kantengewichte ignoriert und nur Knoten zählt, wurden diese nicht mehr angegeben. Formal handelt es sich hierbei um die Suche nach einem längsten Pfad in einem ungewichteten Graphen. Die Pfade, die über die Bildung der transitiven Hülle neu dazu kamen, sind grau angedeutet.

Im Graphen G_{S_1} gibt es eine Kante vom grünen Knoten $(1, 5)$ zum blauen $(1, 6)$, obwohl diese direkte Kante in G^* gelöscht wurde. Das liegt an der Verbindung $(2, 3) \rightarrow (2, 4) \rightarrow (2, 5) \rightarrow (2, 7)$ und $(1, 5) \leq_{S_1} (1, 6)$. Die Kante $(1, 8) \rightarrow (1, 6)$ gibt es aber nicht, obwohl diese in der transitiven Hülle verbunden sind. Das liegt an $(1, 8) \not\leq_{S_1} (1, 6)$. Der hellblaue Knoten enthält keine Stelle aus S_1 und ist daher nicht Teil von V_{S_1} .

Wie schon beim Blick auf den ersten Sukzessionsgraphen vermutet, ist das Problem die Stelle $(1, 8)$, die für Überkreuzungen sorgt. Sie liegt nicht auf dem längsten Pfad (rot markiert) und wird daher aus der Zusammenhangskomponente des Knoten entfernt. Die längsten Pfade aller anderen Sequenzen besuchen auch alle Knoten der jeweiligen Graphen, weshalb keine weiteren Knoten modifiziert werden müssen.

4.3.3. Algorithmus zur Bestimmung eines längsten Pfads

Es sei ein gerichteter, azyklischer Graph $G = (V, E)$ gegeben. Ein einfacher Ansatz für die Bestimmung eines längsten Pfades wäre es einen Algorithmus, der auch mit negativen Kantengewichten rechnen kann, zu benutzen, um im Graphen mit negierten Kantengewichten $G^- = (V, E^-)$ den kürzesten Pfad zu berechnen. Der kürzeste Pfad mit umgedrehten Kantengewichten entspricht genau dem längsten Pfad im Ursprungsgraphen. Mit dem Algorithmus von Bellman-Ford lässt sich ein kürzester Pfad von einem Ausgangsknoten (hier v_{start}) zu allen anderen Knoten im Graphen in $O(|V| \cdot |E|) = O(n^3 \cdot L^3)$ berechnen [CLRS09, S.651ff.]. Anders als beispielsweise der gierige Algorithmus von Dijkstra kann Bellman-Ford auch mit negativen Kanten umgehen, solange der Graph keine negativen Zyklen enthält.

Weil unsere Graphen G_{S_i} azyklisch sind, lässt sich die Berechnung der längsten Pfade mit der *topologischen Sortierung* der Knoten effizienter umsetzen.

4.3.4 Definition (Topologische Sortierung[CLRS09, S.612])

Eine *topologische Sortierung* von DAG $G = (V, E)$ ist eine lineare Aufzählung der Knoten in V bei der ein Knoten v hinter einem Knoten u auftaucht, wenn es eine Kante $(u, v) \in E$ gibt.

Die topologische Sortierung liefert eine mögliche Aufzählung der Knoten, die die Halbordnung des Graphen erhält. Im Allgemeinen ist sie nicht eindeutig.

Mit Hilfe einer Tiefensuche lässt sich die topologische Sortierung in $\Theta(|V| + |E|)$ berechnen [CLRS09, S.612ff.]. Das Ergebnis ist eine Liste der Knoten in topologischer Reihenfolge. Die Liste können wir zur Berechnung des längsten Pfades nutzen, indem wir zusätzlich für jeden Knoten die Länge des längsten Pfades und den Vorgänger in diesem speichern. Wir starten bei v_{start} mit Länge 0 und Vorgänger „NIL“. Aufgrund der gegebenen topologischen Sortierung wissen wir, dass jeder Knoten erst dann bearbeitet wird, wenn seine Vorgänger bereits behandelt wurden. Vorgänger und längster Pfad bis zu diesem Knoten lassen sich also rekursiv berechnen:

$$\begin{aligned} \text{distance}(v_{\text{start}}) &= 0 \\ \text{distance}(v) &= \max\{\text{distance}(u) + w((u, v)) \mid (u, v) \in E \wedge v \neq v_{\text{start}}\} \end{aligned} \quad (4.5)$$

Der Vorgänger für die Knoten wird dann abhängig von der gewählten Kante gesetzt, die die größte Gesamtlänge liefert. Das Kantengewicht $w(u, v)$ ist in unserem Fall 1, weil wir wie in einem ungewichteten Graphen nur die Anzahl der Knoten von v_{start} bis v_{end} zählen. Die Korrektheit des Algorithmus folgt aufgrund der Korrektheit der Rekursionsgleichung und weil $\text{distance}(u)$ wegen der topologischen Sortierung bereits berechnet wurde für Knoten u , wenn eine Kante (u, v) existiert.

Jetzt kennen wir die Länge des längsten Pfades, müssen aber noch die Knoten, die zu diesem gehören, berechnen. Dazu nutzen wir einen Backtracking-Algorithmus, indem wir mit dem letzten Knoten starten und solange den Vorgänger auswählen, bis es keinen mehr gibt. Bei unserem Graphen G_{S_i} ist das einfach, weil mit v_{start} und v_{end} auf jeden Fall der erste und letzte Knoten unseres längsten Pfades bekannt sind. In allgemeinen DAGs muss man zuerst in linearer Zeit über die Liste iterieren und den Knoten mit der maximalen gespeicherten Länge als Endknoten des Pfades und Startknoten des Backtrackings wählen.

4. Ein Min-Cut-Ansatz für das Konsistenzproblem

Algorithmus 6 Algorithmus zum Berechnen eines längsten Pfads in einem Graphen G_{S_i}

Require: DAG $G = (V, E)$ mit v_{start} und v_{end}

```
1: procedure LONGESTPATH( $G$ )
2:   topoSortList  $\leftarrow$  topologicalSort( $G$ )
3:   distance( $v_{\text{start}}$ )  $\leftarrow$  0
4:   predecessor( $v_{\text{start}}$ )  $\leftarrow$  NIL
5:   currentNode  $\leftarrow$   $v_{\text{start}}$ 
6:   while currentNode  $\neq$  NIL do                                 $\triangleright$  Max. Distanz zu  $v_{\text{start}}$  über akt. Knoten
7:     for (currentNode,  $v$ )  $\in E$  do
8:       if distance(currentNode) + 1 > distance( $v$ ) then
9:         distance( $v$ )  $\leftarrow$  distance(currentNode) + 1
10:        predecessor( $v$ )  $\leftarrow$  currentNode
11:      end if
12:    end for
13:    currentNode  $\leftarrow$  currentNode.next
14:  end while
15:  longestPath  $\leftarrow$  empty                                        $\triangleright$  initialisiere Ausgabeliste
16:  currentNode  $\leftarrow$   $v_{\text{end}}$ 
17:  while currentNode  $\neq$  NIL do                                    $\triangleright$  Backtracking
18:    longestPath.addFirst(currentNode)
19:    currentNode  $\leftarrow$  predecessor(currentNode)
20:  end while
21:  Return longestPath
22: end procedure
```

Im nächsten Kapitel wird die Implementierung dieses Algorithmus beispielhaft für das ganze Verfahren beschrieben. Da dort auch ein konkretes Beispiel behandelt wird, wird an dieser Stelle darauf verzichtet.

Korrektheit und Laufzeit des Algorithmus für die Berechnung eines längsten Pfads

Korrektheit per Schleifeninvariante beweisen.

Im Allgemeinen hat dieser Algorithmus eine Laufzeit von $O(|V| + |E|)$. Die topologische Sortierung benötigt $\Theta(|V| + |E|)$ Rechenschritte. Für die Berechnung der Distanzwerte müssen in jedem der $O(|V|)$ Knoten das Maximum der Knoten über eingehende Kanten berechnet werden. Jede Kante wird nur einmalig betrachtet und somit ist die Summe der Kosten aller Maximumoperationen in $O(|E|)$. Der Backtrackingprozess ist in linearer Zeit in der Größe der Anzahl der Knoten möglich.

Wenn wir G_{S_i} betrachten, dann stellen wir fest, dass $|V| \in O(L)$ und $|E| \in O(L^2)$ liegen aufgrund der zuvor berechneten transitiven Hülle G^+ . Für die Berechnung des längsten Pfads folgt somit eine Laufzeit von $O(L^2)$.

Die Korrektheit folgt aufgrund der Eigenschaften der topologischen Sortierung. Sobald ein Knoten als currentNode gewählt wurde, ist seine maximale Distanz vom Startknoten in distance(currentNode) gespeichert, weil alle Knoten, über die ein längerer Pfad hätte laufen, in der topologischen Sortierung vor diesem standen. Aufgrund des Aufbaus unserer Graphen G_{S_i} verläuft der längste Pfad auf jeden Fall über v_{start} und v_{end} und diese

sind auch erster und letzter Knoten einer topologischen Sortierung. Da der Graph der Eingabe zyklenfrei ist, ist das Berechnen einer topologischen Sortierung möglich und der Backtrackingprozess endet nach einer endlichen Anzahl an Schritten. Somit terminiert der Algorithmus.

4.3.4. Verankerungen

[MPDS06] haben einen semiautomatisierten Ansatz für das Multiple-Sequence-Alignment-Problem entwickelt. Bei diesem kann der Benutzer, der über Expertenwissen verfügt, vorgeben, welche Positionen der Sequenzen auf jeden Fall miteinander aligniert werden sollen. Das ist insbesondere dann nützlich, wenn es Abschnitte gibt, die sich mathematisch gesehen sehr ähnlich sind, deren Zuordnung biologisch aber falsch wäre. Ein Beispiel für solche Sequenzen haben wir mit den Tandemduplikaten im Abschnitt 3.7.3 über die Schwächen von DIALIGN bereits kennengelernt. Es hat sich herausgestellt, dass das semi-automatisierte Verfahren bei vielen Tests auf der Referenzdatenbank BALiBASE bessere Ergebnisse geliefert hat, wenn die Startpunkte aller Motive als *Verankerungen* gesetzt wurden.

Das Verfahren funktioniert so, dass der Experte Fragmente (die auch nur paarweise Zuweisungen sein können) wählt und diese mit einer Dringlichkeit an DIALIGN übergibt. Wie im Standardalgorithmus werden dann die Fragmente mit maximaler Dringlichkeit gierig gewählt, die zu allen bereits gewählten konsistent sind. Zwischen diesen *Verankerungen* wird dann ganz normal DIALIGN durchgeführt, wodurch die restlichen Abschnitte automatisiert aligniert werden.

[CPM10] benutzten die bereits vorliegende Infrastruktur in DIALIGN, um die Zuweisungsspalten, die der Algorithmus von Pitschi geliefert hat, als Verankerungen ins Alignment zu integrieren. Weil diese Möglichkeit in unserer Implementierung nicht bereits vorhanden ist, werden wir die Resultate des Min-Cut-Ansatzes direkt mit Hilfe von *EdgeAddition* und dem Alignmentgraphen in unser Ergebnis integrieren. Neben dem Übergeben von konsistenten Zuweisungsspalten als Verankerungen hat man auch Versuche mit partiellen Zuweisungsspalten gemacht. Hier war die gierige Heuristik von DIALIGN aber nicht erfolgreich und die Ergebnisse waren schlechter als mit dem Algorithmus von Pitschi. Aus diesem Grund werden wir den zweiten Ansatz nicht weiter behandeln.

4.3.5. Komplexität des Algorithmus von Pitschi

Der Sukzessionsgraph $SG(C)$ kann aus dem Inzidenzgraphen in $O(n \cdot L)$ Rechenschritten berechnet werden, weil es höchstens so viele partielle Zuweisungsspalten gegeben kann. Außerdem ist die Anzahl der direkten Nachfolger pro Sequenz auch durch L begrenzt, was eine obere Grenze für die Anzahl der Kanten liefert.

Die transitive Hülle für G^+ berechnen wir beispielsweise durch Breitensuche für jeden Knoten. Weil es $O(n \cdot L)$ Knoten geben kann und jeder dieser Aufrufe $O(n \cdot L)$ Rechenschritte benötigt, weil dies die maximale Anzahl an Kanten und Knoten ist, folgt hierfür die Laufzeit von $O(n^2 \cdot L^2)$. Eine in der Praxis mögliche Verbesserung könnte wie folgt aussehen: zuerst wird eine topologische Sortierung berechnet und von hinten nach vorne bearbeitet. Die transitive Hülle eines Knotens u kann dabei durch Vereinigung aller Knoten v mit $(u, v) \in E$ sowie deren transitive Hülle berechnet werden. Im schlimmsten Fall liegen $O(L)$ Ebenen in dem Graphen mit je bis zu $O(n)$ Knoten und $O(n)$ Kanten in andere Ebenen vor. Es kommt pro Ebene also zu bis zu $O(n)$ vielen Vereinigungen. Weil die Mengen, die miteinander

4. Ein Min-Cut-Ansatz für das Konsistenzproblem

vereinigt werden, aber bis zu $O(n \cdot L)$ Elemente enthalten (potentiell erreichbare Knoten), folgen selbst unter Verwendung von Bit-Sets und der Vereinigung von Mengen über das bitweise Oder Kosten von $O(n^2 \cdot L)$ pro Ebene. Auf Grund der $O(L)$ Ebenen bleibt es bei der Laufzeit von $O(n^2 \cdot L^2)$, selbst wenn dieser Algorithmus in der Praxis sehr schnell sein dürfte. Weil im Allgemeinen nicht davon ausgegangen werden kann, dass der Graph signifikant viel weniger starke Zusammenhangskomponenten als Knoten insgesamt enthält, liefert auch der Algorithmus von Purdom zur Berechnung einer transitiven Hülle keine bessere Laufzeit.

Für das Konstruieren der Graphen G_{S_i} unserer Sequenzen S_1, \dots, S_n benötigen wir jeweils lineare Zeit in der Größe des Graphen G^+ , um zu überprüfen welche Knoten Stellen der jeweiligen Sequenz enthalten und welche Kanten die Relation \mathcal{R}_{S_i} erfüllen. Zwar kann es grundsätzlich $O(n \cdot L)$ Knoten geben und jeder Knoten bis zu $O(n)$ Stellen, aber die Gesamtanzahl an Stellen ist durch $n \cdot L$ begrenzt. Bei n Sequenzen folgt die Laufzeit in $O(n^2 \cdot L)$.

Die längsten Pfade für alle Sequenzen benötigen n -mal $O(L^2)$. Zudem müssen die nicht besuchten Stellen für jede Sequenz aus ihren Knoten gelöscht werden. Dazu iterieren wir wieder n -mal über die Graphen mit bis zu $O(L)$ Knoten. Wie schnell es möglich ist, die Stellen aus dem dazugehörigen Knoten zu löschen, hängt von der intern verwendeten Datenstruktur ab. Im schlimmsten Fall brauchen wir $O(n)$ Zeit für die Entfernung einer Stelle aus einem Knoten. Alle Löschoperationen sind dementsprechend in $O(n^2 \cdot L)$ Rechenschritten möglich.

Insgesamt dominiert das Berechnen der transitiven Hülle die Komplexität des Algorithmus von Pitschi mit $O(n^2 \cdot L^2)$. Weil der vorangegangene Schritt mit den minimalen Schnitten aber ohnehin eine deutlich höhere Komplexität hat, ist es müßig hier nach effizienteren Ansätzen zu suchen.

4.4. Abschluss und Zusammenfassung

Nach dem Algorithmus von Pitschi liegen uns konsistente Zuweisungsspalten vor. Diese können aufgrund ihrer Konsistenz direkt in das finale Alignment eingefügt werden. Trotzdem müssen wir die Transitivitätsgrenzen mit dem Alignmentgraphen verwalten. Das liegt daran, dass wir wie bei DIALIGN zwischen den ursprünglichen Konsistenzgrenzen auf den Teilsequenzen DIALIGN benutzen. Auch hier kann davon ausgegangen werden, dass die Anzahl der Durchläufe konstant ist. Zu guter Letzt wird die Ausgabe vorbereitet. Das Vorgehen ist an dieser Stelle identisch mit dem der ursprünglichen DIALIGN-Implementierung, das in Kapitel 3 beschrieben wurde.

Ein Nachteil des Min-Cut-Ansatzes ist das Lösen vom streng segmentbasierten Ansatz von DIALIGN. Dieser stellt zwar nach wie vor die Basis des Verfahrens dar, aber durch die minimalen Schnitt und den Algorithmus von Pitschi werden einzelne Verbindungen gelöscht. Möglicherweise sind unter den gelöschten Zuweisungen auch konsistente enthalten. Um sicherzustellen, dass diese Teil des Alignments sind, wenn sie zu Unrecht gelöscht wurden, iterieren wir einmalig über alle ursprünglichen Fragmente der paarweisen Alignments und fügen konsistente Zuweisungen von nicht mehr miteinander alignierten Stellen ein, wenn diese einen positiven Ähnlichkeitswert haben.

4.4.1. Beispiel

Nach dem Berechnen der konsistenten Zuweisungsspalten sieht das multiple Alignment für unser Beispiel wie folgt aus. Der Übersichtlichkeit halber wurden hier bereits Lücken eingefügt, um die Zuweisungen zu verdeutlichen. Üblicherweise erfolgt dieser Schritt erst ganz am Ende des Verfahrens.

1. aDGTC---TcA
2. --GTCADcTcA
3. -taTCADgg--
4. -DGTCADaTC-

Schaut man sich die letzten Stellen der Sequenzen 1 und 2 an, dann stellt man fest, dass deren Symbole identisch sind und sie zudem Teil des Fragments CTCA am Ende der beiden Sequenzen waren. Beim linearen Durchlauf über alle Fragmente stellen wir also fest, dass diese konsistent sind und fügen sie in das Alignment ein.

Versucht man jetzt DIALIGN auf den Teilsequenzen zwischen den bereits zugewiesenen Stelle zu benutzen, stellt man fest, dass es keine weiteren Fragmente mit positiven Überlappgewichten gibt. Nach dem ersten DIALIGN-Lauf wird also abgebrochen und die finale Ausgabe kann vorbereitet werden.

Das Ergebnis sieht letztendlich wie folgt aus. Auf der rechten Seite finden wir zum Vergleich das Ergebnis von DIALIGN 2.2 mit der gierigen Heuristik.

- | | |
|----------------|---------------|
| 1. aDGTC---TcA | aDGTCTCA----- |
| 2. --GTCADcTcA | --G--TCADCTcA |
| 3. -taTCADgg-- | ---TATCADgg-- |
| 4. -DGTCADaTC- | -DG--TCADATC- |

Wie man sieht, kommt dieses Alignment mit deutlich weniger eingefügten Lücken aus. Das liegt daran, dass nicht wenige große Fragmente mit hohen Gewichten das ganze Alignment dominieren können und andere sinnvolle Zuweisungen aufgrund der gierigen Heuristik verhindern.

Welches der beiden Ergebnisse besser ist, lässt sich nicht zweifelsfrei sagen, weil diese DNA-Sequenzen willkürlich gewählt wurden und es in ihnen keine biologisch bedeutenden Motive gibt. Man kann die Ergebnisse aber mathematisch über die Anzahl an identischen und abweichenden Paaren von Zuweisungen vergleichen.

Beim Min-Cut-Alignment gibt es dabei 30 Zuweisungen identischer Symbole und keine von abweichenden. DIALIGN 2.2 liefert uns hingegen 28 übereinstimmende und 2 abweichende Paare von Stelle. Dieses Ergebnis deutet auf die Vorteile des graphtheoretischen Ansatzes hin.

4.4.2. Gesamtkomplexität des Min-Cut-Ansatzes

Nachdem das ganze Verfahren gezeigt wurde, können wir seine Gesamtlaufzeit zusammenfassen.

4.4.1 Korollar ([CPM10])

Mit dem Min-Cut-Ansatz von Corel et al. lässt sich ein multiples Sequenzalignment in $O(n^4 \cdot L^{7/2})$ Zeit berechnen.

4. Ein Min-Cut-Ansatz für das Konsistenzproblem

Beweis. DIALIGN berechnet die $O(n^2)$ paarweisen Alignments, wie in Satz 3.3.3 gezeigt, in $O(n^2 \cdot L^2)$ Rechenschritten. Die Laufzeit der Berechnung der partiellen Zuweisungsspalten mit Hilfe des minimalen Schnitts liegt, wie in Abschnitt 4.2.5 gezeigt, in $O(n^4 \cdot L^{7/2})$. Der Algorithmus von Pitschi hat eine Komplexität von $O(n^2 \cdot L^2)$. Für den Alignmentgraphen sind laut Korollar 3.5.9 nach wie vor $O(n^3 \cdot L^2 + n^2 \cdot L^2)$ Berechnungen nötig. Es folgt, dass die Berechnung des minimalen Schnitts auf dem Inzidenzgraphen die Laufzeit dominiert, womit sich eine Gesamtkomplexität von $O(n^4 \cdot L^{7/2})$ ergibt. \square

4.4.3. Probleme bei der Heuristik zum Entfernen von Kanten

Die Heuristik zum Entfernen von Kanten kann bei einigen Sequenzen zu größeren Problemen führen. Diese Heuristik funktionierte so, dass sie eine Grenze k für das minimale Kantengewicht sukzessive erhöhte und alle Kanten unter k entfernte, bis die Menge an Kanten ohne Zyklus war.

In den meisten Fällen ist das kein Problem, weil man davon ausgeht, dass die wichtigen Motive, die wir finden wollen, in der gleichen Reihenfolge innerhalb der Eingabesequenzen liegen. Problematisch sind hingegen Sequenzfamilien, bei denen zwei oder mehr größere Abschnitte in ihrer Reihenfolge vertauscht wurden und einige Sequenzen diese in der einen, die anderen aber in den der umgekehrten Reihenfolge haben.

Sind die vertauschten Abschnitte lang genug, dann werden sie Teil der paarweisen Alignments. Weil es sich bei ihnen um Überkreuzungen handelt, entfernt der Min-Cut-Ansatz sie im Allgemeinen auch nicht. Kommen diese Permutationen in genug Sequenzen vor, dann ist das Ergebnis ein Sukzessionsgraph mit einem Zyklus, der Kanten mit sehr hohen Kantengewichten enthält. Um diese Zyklen aufzulösen, wird dann auch eine sehr hohe Grenze k^* benötigt. Im schlimmsten Fall werden so alle Kanten im Graph gelöscht, in jedem Fall aber sehr viele, die nichts mit dem eigentlichen Zyklus zu tun haben, weil der Schritt global Kanten löscht. Somit gehen viele wichtige oder alle Verbindungen in unserem Alignment verloren. Optimal wäre es, wenn die überkreuzten Stellen nicht aligniert werden, der Rest hingegen normal.

Bis jetzt haben wir dieses Problem nur auf theoretischer Ebene betrachtet. Es gibt aber Sequenzfamilien, bei denen ein solches Verhalten wirklich auftritt. Ein Beispiel dafür ist die sogenannte *zirkuläre Permutation* bei Proteinen. Bei diesen kommen zwar die selben Abschnitte, aber in veränderter Reihenfolge vor, wie beispielsweise bei den abstrahierten Proteinsequenzen [A,B,C,D] und [B,C,D,A]. Hier wurde der Abschnitt A vom Anfang der ersten Sequenz entfernt und am Ende angefügt. Erstmals wurde dieses Phänomen von [CHHE79] beschrieben. Wenn es im Laufe der Zeit zu einer zirkulären Permutation gekommen ist, deren Ergebnis zwei Sequenzen sind und wir eine Sequenzfamilie vorliegen haben, bei der die eine Hälfte von der einen und die andere von der anderen dieser Sequenzen abstammt, dann kann es durchaus zum oben beschriebenen Verhalten kommen.

Mit einer verbesserten Heuristik zum Entfernen von Kanten aus dem Sukzessionsgraph, um die Zyklen aufzulösen, könnte man diesem Problem vorbeugen. Ein solcher Algorithmus wurde beispielsweise von Eades et al. beschrieben, der in $O(|E|)$ Zeit einen DAG berechnet und dabei höchstens $|E|/2 - |V|/6$ Kanten entfernt [ELS93]. Leider löscht auch dieser im Allgemeinen sehr viele Kanten, die nichts mit dem Zyklus zu tun haben. Weil man bei nahezu allen Sequenzfamilien davon ausgehen kann, dass Permutationen kein Problem sind, halte erscheint die ursprüngliche Heuristik zunächst praktikabler. Denkbar ist aber ein hybrider Ansatz, bei dem wir überprüfen, wie viele Kanten E_{k^*} im Verhältnis zur

Grafik einfügen.

alten Kantenanzahl enthält. Ist dieses Verhältnis zu gering (beispielsweise kleiner als $3/4$), benutzen wir stattdessen den angesprochenen Algorithmus von Eades, Lin und Smyth auf den ursprünglichen Kanten unseres Sukzessionsgraphen.

4.4.4. Evaluierung

Corel et al. haben ihre Implementierung des Verfahrens einer Vielzahl an Tests unterzogen, um sie mit einer breiten Auswahl an etablierten Verfahren zu vergleichen [CPM10]. Die Ergebnisse wurden dabei auf drei Referenzdatenbanken getestet, die jeweils eine Menge von alignierten Sequenzfamilien zur Verfügung stellen für die eine biologisch korrekte Zuweisung bekannt ist. Zum Test auf globale verwandten Sequenzen wurde die Referenzdatenbank BALiBASE benutzt [TPP99]. Diese enthält Alignments von Proteinsequenzen, die auf der ganzen Länge der Sequenzen Ähnlichkeiten haben. Lokal verwandte Sequenzen haben hingegen nur an einzelnen Stellen Ähnlichkeiten und zwischen diesen verwandten Segmenten sind nicht in Beziehung zueinander stehende Symbole. Für diese Art von Sequenzen wurden Tests auf den Datenbanken IRMBASE (Proteine) und DIRMBASE (DNA) durchgeführt.

Für mehrere Sequenzfamilien dieser Datenbanken wurden dann mit dem Min-Cut-Ansatz und durch andere Alignmentprogramme, wie DIALIGN 2.2 und DIALIGN TX (neueste, aber nicht unmittelbare Weiterentwicklung von DIALIGN), T-COFFEE, MAFFT, Alignments berechnet und miteinander verglichen. Für die Vergleiche dienten wieder der *sum-of-pairs-Score* (SP) und der *(total-)column-Score* (TC), die die Anzahl an korrekten Paaren beziehungsweise komplett korrekten Spalten im Vergleich zum Referenzalignment angeben.

Lokale Alignments auf IRMBASE2 und DIRMBASE1

Die Sequenzen der Referenzdatenbanken IRMBASE2 und DIRMBASE1 wurden so konstruiert, dass lokal einzelne Motive in zufällig erstellte und nicht zueinander in Beziehung stehende Sequenzen hinzugefügt wurden.

Es hat sich herausgestellt, dass die neueste Version von DIALIGN TX nach wie vor die besten Ergebnisse auf lokal verwandten Sequenzen liefert, gefolgt von DIALIGN 2.2. Der Min-Cut-Ansatz hatte auf den Proteinsequenzen von DIRMBASE starke Ergebnisse ergeben, die mit denen der beiden DIALIGN-Varianten vergleichbar sind. Auf DNA-Sequenzen waren die Ergebnisse nach wie vor ordentlich, aber signifikant schlechter im Vergleich zu den beiden gierigen Verfahren. Im Vergleich zu den globalen Alignierern, wie CLUSTALW 2.0 oder T-COFFEE schnitt das Min-Cut-Verfahren aber sehr gut ab [CPM10]. Die einzige Ausnahme ist das Programm MAFFT, das Sequenzen mit Hilfe der schnellen Fouriertransformation gruppiert und sie dann progressiv aligniert. MAFFT lieferte auf Protein- und DNA-Sequenzen gute Ergebnisse, die beinahe an die der DIALIGN-Varianten herankommen.

BALiBASE3

Ein Problem bei den Tests war aber die Laufzeit auf einigen Sequenzfamilien. Wie bereits in Abschnitt 4.2.5 über die Komplexität von *ResolveAmbiguities* beschrieben, war die Laufzeit auf einigen Sequenzfamilien so lang, dass es nicht möglich war in angemessener Zeit Alignments zu berechnen. Deshalb war es nötig zusätzlich eine Grenze T für das

4. Ein Min-Cut-Ansatz für das Konsistenzproblem

minimale Gewicht eines Fragments einzuführen, wodurch sich die Anzahl der Kanten im Inzidenzgraphen verringert. Diese Grenze T sorgt im Gegenzug zur verbesserten Laufzeit aber auch für etwas schlechtere Ergebnisse [CPM10].

Insgesamt stellt der neue Ansatz auf global verwandten Sequenzfamilien eine deutliche Verbesserung zu DIALIGN 2.2 dar. So waren bei allen sechs getesteten Referenzmengen, die jeweils eine Vielzahl an Sequenzfamilien enthalten, die Ergebnisse des min-cut-Verfahrens besser. Das gilt sowohl für die SP-, als auch für die TC-Scores. Mit den besten globalen Alignierern kann das Verfahren zwar nicht konkurrieren, der verbreitete progressive Algorithmus CLUSTALW 2.0 wurde aber in allen Tests geschlagen.

Betrachtung der Scores im Vergleich

Um festzustellen, wie ihr Ansatz numerisch abschneidet, haben [CPM10] die Scores der Gewichtsfunktionen von den Ergebnissen ihres Algorithmus mit denen von DIALIGN auf den sechs getesteten Referenzfamilien von BALiBASE verglichen. Man hat festgestellt, dass die Scores des Min-Cut-Algorithmus auf vier der sechs Referenzfamilien geringer sind als mit DIALIGN 2.2. Weil gleichzeitig die TC- und SP-Scores ihres Algorithmus besser waren, werten die Autoren dies als Indiz dafür, dass die Gütefunktion letztendlich nur eingeschränkt funktioniert. Wenn diese ein schlechtes Maß für die Güte eines Alignments ist und gleichzeitig mit Hilfe von Heuristiken versucht wird die Gütefunktion zu maximieren, dann ist es logisch, dass bessere Heuristiken mit höheren Scores nicht automatisch auch biologisch bessere Ergebnisse liefern. [CPM10] folgern aufgrund der Ergebnisse mit biologisch besseren Alignments bei gleichzeitig numerisch schlechteren Ergebnissen in der Gütefunktion, dass unter Weiterverwendung dieser keine größeren Verbesserungen der DIALIGN-Verfahren mehr möglich sind. Mögliche Auswege daraus werden im Abschnitt 6.2 beschrieben.

Leider gehen die Autoren nicht darauf ein, wie für die Alignments des Min-Cut-Ansatzes nachträglich die numerischen Scores berechnet wurden. Durch die Berechnung der minimalen Schnitt und den Algorithmus von Pitschi werden mitunter auch einzelne Stelle aus den Zuweisungen gelöscht, sodass die Ergebnisse nicht immer längere, zusammenhängende Fragmente sind. Interpretiert man einfach ohne Lücke aufeinanderfolgenden, einander zugewiesene Stelle als Fragmente, dann erscheint es logisch, dass die Scores geringer sind. Das liegt an der Gewichtsfunktion von DIALIGN, die bei jedem Fragment einen Korrekturterm K abzieht, der von der Länge der Sequenzen abhängt. Viele kurze Fragmente, wie sie beim Min-Cut-Algorithmus auftreten, haben im Allgemeinen immer ein geringeres Gesamtgewicht als weniger kurze mit der selben Gesamtlänge. Im Kontext dieser Erkenntnis stimme ich mit der Schlussfolgerung von Corel also nicht uneingeschränkt überein, solange nicht klar ist wie die Scores genau berechnet wurden.

4.4.5. Zusammenfassung des Min-Cut-Ansatzes

5. Programmierung

Beispielhaft für das komplette Min-Cut-Verfahren wurde der Algorithmus zur Berechnung eines längsten Pfades aus dem Algorithmus von Pitschi implementiert. Dabei wurden die Programmiersprache C++ und die *Boost Graph Library* verwendet [SLL00]. C++ ist aufgrund der guten Laufzeiten die kanonische Wahl beim komplexen Berechnen von multiplen Alignments und die Boost Graph Library stellt eine Vielzahl an effizienten Graphdatenstrukturen und darauf arbeitende Algorithmen zur Verfügung. Für alle Methoden wurden mit dem Framework Catch2 Unit-Tests geschrieben [Cat17].

Um dem eigentlichen Algorithmus etwas Kontext zu geben, wurden die drei Klassen *Site*, *SuccessionNode* und *SuccessionGraphSeq* implementiert. Die Klasse *Site* modelliert Stellen aus dem Stellenraum S einer Menge von Sequenzen. Objekte der Klasse können mit \leq auf der Halbordnung des Stellenraums verglichen werden. Der Übersichtlichkeit halber wurden die Doxygenkommentare aus der Implementierung gekürzt.

```
1 class Site{
2 private:
3     unsigned int sequence; // the sequence this site belongs to
4     unsigned int position; // the position of this site in its sequence
5
6 public:
7     Site(unsigned int seq, unsigned int pos);
8
9     unsigned int getSequence() const;
10    unsigned int getPosition() const;
11
12    // Operator to compare two sites for equality. Checks if sequence and position are the
13    // same.
14    bool operator==(const Site& rhs) const;
15
16    // Operator to decide if the current site is smaller than or equal to the one it is
17    // compared to.
18    bool operator <=(const Site& rhs) const;
19 };

```

Die Klasse *SuccessionNode* modelliert Knoten aus dem Sukzessionsgraphen. Intern wurde auf eine `std::unordered_map` zur Speicherung der Stellen zurückgegriffen, bei dem die Sequenznummer den Schlüssel einer Stelle angibt, weil jeder Knoten höchstens eine Stelle pro Sequenz enthalten darf. Objekte dieser Klasse mit einer Menge von Stellen werden beim Algorithmus von Pitschi zwar erstellt, es werden aber niemals neue Knoten hinzugefügt. Deshalb gibt es zwar Funktionen zum Entfernen von Stellen, wie man sie nach der Berechnung der längsten Pfade braucht, nicht jedoch zum Hinzufügen neuer *Site*-Objekte.

```
1 class SuccessionNode{
2 private:

```

5. Programmierung

```
3 std::unordered_map<unsigned int, Site> sites; // internal representation of the set of
   ↳ sites of this node
4
5 public:
6 // Default constructor with empty set of sites.
7 SuccessionNode();
8
9 // Constructor that builds a new succession node for a set of sites.
10 SuccessionNode(const std::unordered_map<unsigned int, Site>& sites);
11
12 // Compares this SuccessionNode with a second one for equality.
13 bool operator==(const SuccessionNode& rhs) const;
14
15 // Deletes a site from sites, if it is part of the node.
16 void deleteSite(const Site& site);
17
18 // Deletes the site that belong to the given sequence number.
19 void deleteSiteOfSeq(unsigned int sequence);
20
21 std::unordered_map<unsigned int, Site> getSites() const;
22 };
```

Die wichtigste Klasse ist SuccessionGraphSeq, die den erweiterten Sukzessionsgraphen G_{S_i} beschränkt auf eine Sequenz S_i angibt. Die Objekte dieser Klasse speichern die dazugehörige Sequenznummer, den Graphen über die SuccessionNode-Objekte und jeweils einen ausgewiesenen Start- und Endknoten im Graphen. Die einzige nicht-triviale Methode dieser Klasse ist longestPath(), die den längsten Pfad durch den Graphen berechnet und in einer Doppelwarteschlange von Knoten ausgibt.

```
1 // Define a bidirectional type of graph where every vertex holds a SuccessionNode object
2 typedef boost::adjacency_list<boost::vecS, boost::vecS, boost::directedS,
   ↳ VertexProperty> Graph;
3
4 // Define a shorter name for the type of vertices
5 typedef Graph::vertex_descriptor vertex_t;
6
7 class SuccessionGraphSeq{
8 private:
9 unsigned int sequence; // number of the sequence this graph belongs to
10 Graph& data;           // the actual data of the succession graph restricted on this
11                        // sequence; it is a directed, unweighted graph fulfilling the
12                        // above requirements
13 vertex_t vStart;       // artificial start vector of the succession graph
14 vertex_t vEnd;         // artificial end vector of the succession graph
15 public:
16 SuccessionGraphSeq(unsigned int seq, Graph& data, vertex_t startVertex, vertex_t
   ↳ endVertex);
17
18 SuccessionGraphSeq(SuccessionGraphSeq& rhs) = delete; // prevent copy
   ↳ constructor to be called
19 SuccessionGraphSeq& operator=(const SuccessionGraphSeq& rhs) = delete; // prevent
   ↳ assignments
20
21 vertex_t getStartVertex() const;
22
23 vertex_t getEndVertex() const;
```

```

24
25 // Computes the longest path.
26 std::deque<SuccessionNode> longestPath() const;
27 };

```

In einer vollständigen Implementierung des Verfahrens würden die `SuccessionGraphSeq`-Objekte lediglich einmalig erstellt und nach der Berechnung des längsten Pfades wieder gelöscht werden. Deshalb ist das Objekt, das den Graphen konstruiert, für den ordnungsgemäßen Zustand verantwortlich und es wird für `longestPath()` davon ausgegangen, dass der Zustand des Objekts valide ist. Die Bedingungen, die eingehalten werden müssen, sind:

1. Die Knoten `vStart` und `vEnd` müssen tatsächlich Knoten des Graphen `data` sein.
2. Alle Knoten müssen auf einem Pfad von `vStart` nach `vEnd` liegen.
3. Jeder Knoten enthält höchstens eine Stelle pro Sequenz.
4. Jede Kante erhält die natürliche Ordnung der Sequenz des Graphen.
5. Der Graph muss azyklisch, also ein DAG, sein.

Der Algorithmus für die Berechnung eines längsten Pfades berechnet bestimmt zunächst mit einer Bibliotheksfunktion eine topologische Sortierung der Knoten. Anschließend wird der Reihe nach für jeden Knoten geguckt, ob über ihn ein längerer Pfad vom Startknoten zu einem benachbarten Knoten verläuft. Ist das der Fall, dann werden die `distance` des Nachbarn und sein `predecessor` aktualisiert.

Wurden diese Werte für jeden Knoten bestimmt, dann beginnt der Backtrackingprozess für die Ausgabe. Wir starten mit `vEnd`, weil dieser auf jeden Fall der letzte Knoten des längsten Pfades ist. Danach fügen wir der Reihe nach den Vorgänger vorne zur Ausgabe hinzu, bis `vStart`, der erste Knoten des längsten Pfades, erreicht wurde.

```

1  std::deque<SuccessionNode> SuccessionGraphSeq::longestPath() const{
2      // compute the topological order and store it in a deque
3      // no need to check if the graph is a DAG, this had to be ensured by the object that
4      // ↪ build this object
5      std::deque<vertex_t> topologicalOrder;
6      boost::topological_sort(data, std::front_inserter(topologicalOrder));
7
8      // declare and initialize the maps for storing the distances and predecessors
9      std::unordered_map<vertex_t, vertex_t> predecessors;
10     std::unordered_map<vertex_t, unsigned int> distances;
11
12     for(const auto& vertex : topologicalOrder){
13         predecessors.emplace(vertex, 0);
14         distances.emplace(vertex, 0);
15     }
16
17     // compute for every vertex the predecessor and distance according to the
18     // ↪ topological order
19     typedef boost::graph_traits<Graph>::adjacency_iterator adjacency_iterator;
20
21     for(const auto& vertex : topologicalOrder){
22         unsigned int currentDistance = distances.at(vertex);
23         // retrieve edges of current vertex
24         std::pair<adjacency_iterator, adjacency_iterator> neighbors =
25             boost::adjacent_vertices(vertex, data);

```

5. Programmierung

```

24     while(neighbors.first != neighbors.second){
25         vertex_t currentNeighbor = *neighbors.first;
26         if (currentDistance + 1 > distances.at(currentNeighbor)){ // longer path to
            ⇨ neighbor found -> edit entries
27             distances.erase(currentNeighbor);
28             distances.emplace(currentNeighbor, currentDistance + 1);
29             predecessors.erase(currentNeighbor);
30             predecessors.emplace(currentNeighbor, vertex);
31         }
32         neighbors.first++;
33     }
34 }
35
36 // start with the last vertex v_end, which has to be part of the longest path, and
    ⇨ add it to the output variable
37 std::deque<SuccessionNode> longestPath;
38 vertex_t longestPathVertex = vEnd;
39
40 // as long as the current vertex is valid, add its SuccessionNode to the output and
    ⇨ set the current vertex to its
41 // predecessor
42 while (longestPathVertex != vStart){
43     longestPath.emplace_front(data[longestPathVertex].vertex);
44     longestPathVertex = predecessors.at(longestPathVertex);
45 }
46 longestPath.emplace_front(data[vStart].vertex);
47
48 // return the deque containing the vertices on a longest path from v_start to v_end
49 return longestPath;
50 }

```

5.0.1. Beispiel zu longestPath

In der Main-Methode erstellen wir den Graphen G_{S_1} aus Beispiel 4.7 und berechnen seinen längsten Pfad. Leider ist das Erstellen des Graphen sehr umfangreich, weshalb dieser Prozess hier nicht dargestellt wurde.

Die berechnete topologische Sortierung ist „ $v_{start}, (1, 2), (1, 3), (1, 4), (1, 5), (1, 6), (1, 7), (1, 8), v_{end}$ “. Jede Stelle aus der relevanten Sequenz S_1 steht dabei stellvertretend für den ganzen Knoten. Danach wir pro bearbeitetem Knoten aus der topologischen Sortierung für jeden Knoten den aktuell längsten Pfad vom Startknoten aus und den Vorgänger auf diesem Pfad.

Aktueller Knoten	distance								
	v_{start}	(1, 2)	(1, 3)	(1, 4)	(1, 5)	(1, 6)	(1, 7)	(1, 8)	v_{end}
v_{start}	0	1	1	1	1	1	1	1	1
(1, 2)	0	1	2	2	2	2	2	2	2
(1, 3)	0	1	2	3	3	3	3	3	3
(1, 4)	0	1	2	3	4	4	4	4	4
(1, 5)	0	1	2	3	4	5	5	5	5
(1, 6)	0	1	2	3	4	5	6	5	6
(1, 7)	0	1	2	3	4	5	6	5	7
(1, 8)	0	1	2	3	4	5	6	5	7
v_{end}	0	1	2	3	4	5	6	5	7

Die dazugehörige Tabelle der Vorgänger nach jedem Schleifendurchlauf:

Aktueller Knoten	predecessor								
	v_{start}	(1, 2)	(1, 3)	(1, 4)	(1, 5)	(1, 6)	(1, 7)	(1, 8)	v_{end}
v_{start}	NIL	v_{start}	v_{start}	v_{start}	v_{start}	v_{start}	v_{start}	v_{start}	v_{start}
(1, 2)	NIL	v_{start}	(1, 2)	(1, 2)	(1, 2)	(1, 2)	(1, 2)	(1, 2)	(1, 2)
(1, 3)	NIL	v_{start}	(1, 2)	(1, 3)	(1, 3)	(1, 3)	(1, 3)	(1, 3)	(1, 3)
(1, 4)	NIL	v_{start}	(1, 2)	(1, 3)	(1, 4)	(1, 4)	(1, 4)	(1, 4)	(1, 4)
(1, 5)	NIL	v_{start}	(1, 2)	(1, 3)	(1, 4)	(1, 5)	(1, 5)	(1, 5)	(1, 5)
(1, 6)	NIL	v_{start}	(1, 2)	(1, 3)	(1, 4)	(1, 5)	(1, 6)	(1, 5)	(1, 6)
(1, 7)	NIL	v_{start}	(1, 2)	(1, 3)	(1, 4)	(1, 5)	(1, 6)	(1, 5)	(1, 7)
(1, 8)	NIL	v_{start}	(1, 2)	(1, 3)	(1, 4)	(1, 5)	(1, 6)	(1, 5)	(1, 7)
v_{end}	NIL	v_{start}	(1, 2)	(1, 3)	(1, 4)	(1, 5)	(1, 6)	(1, 5)	(1, 7)

Wie man sieht liegt nur der Knoten (1, 8) nicht auf dem längsten Pfad, weil er der einzige Knoten neben dem Endknoten ist, der in der letzten Zeile nie als Vorgänger auftaucht. Aus der letzten Zeile der Vorgängertabelle lassen sich die Knoten auf einem längsten Pfad ablesen. Dieser beträgt „ v_{start} , (1, 2), (1, 3), (1, 4), (1, 5), (1, 6), (1, 7), v_{end} “.

6. Fazit

6.1. Zusammenfassung

Nachdem wir mit dem Algorithmus von Needleman-Wunsch einen ersten Einblick in Sequenzalignments bekommen haben, wurden im Laufe dieser Arbeit zwei algorithmische Ansätze für das Multiple-Sequence-Alignment-Problem vorgestellt: DIALIGN 2.2 von Morgenstern et al. und der Min-Cut-Ansatz von Corel et al.

DIALIGN 2.2 mit seinen Erweiterungen berechnet solide globale Alignments und ist bei denen von lokalen Sequenzfamilien überragend. Mit Hilfe von dynamischer Programmierung berechnet das speicherplatzeffiziente Verfahren aus DIALIGN 2.2 die quadratisch vielen paarweisen Alignments. Dabei wird jedem möglichen Fragment mit Hilfe der Gewichtsfunktion w^* aus DIALIGN 2.0 ein Gewicht zugewiesen und das Gesamtgewicht aller miteinander konsistenten Fragmente maximiert. Durch eine Einschränkung der zu speichernden Fragmente, konnte der benötigte Speicherplatz weiter gesenkt werden. Um für unser multiples Alignment Fragmente zu bevorzugen, die Übereinstimmungen mit ähnlichen Abschnitten in weiteren Sequenzen haben, berechnen wir im nächsten Schritt Überlappgewichte. Anstelle der naiven Berechnung, die alle Fragmente miteinander vergleicht, habe ich einen effizienteren Algorithmus entwickelt, der auf dem parallelen Traversieren der Listen von Fragmenten aller paarweisen Alignments basiert.

Nachdem die Überlappgewichte berechnet wurden, nutzen wir diese für die Sortierung aller Fragmente. Eine gierige Heuristik wählt jetzt solange das Fragment mit dem höchsten Gewicht, das zu allen zuvor gewählten konsistent ist, bis keine mehr übrig sind. Für die rechenintensive Berechnung der Konsistenzgrenzen haben wir den mit DIALIGN 2.1 eingeführten Ansatz von Abdeddaïm betrachtet. Dieser berechnet mit Hilfe eines Spanning Set of disjoint Paths (SSDP) die transitive Hülle des sogenannten Alignmentgraphen, über den sich die Konsistenzgrenzen berechnen lassen. Solange sich das Alignment durch Fragmente mit positiven Gewichten erweitern lässt, führen wir auf den Teilsequenzen zwischen den Konsistenzgrenzen weitere Durchläufe von DIALIGN durch. Schlussendlich fügen wir für unsere Ausgabe Lücken in die Menge von alignierten Sequenzen ein, sodass alle Zuweisungsspalten genau untereinander stehen.

Der im Kern auf DIALIGN basierende Ansatz von Corel et al. erweitert das DIALIGN-Verfahren um graphentheoretische Ansätze [CPM10]. Der Hauptunterschied zum ursprünglichen Verfahren ist, dass eine Menge von multiplen Zuweisungen auf eine konsistente Menge verringert wird, statt nach und nach mit paarweisen Zuweisungen ein Alignment aufzubauen. Zunächst werden dafür die Verbindungen aller paarweisen Alignments in einem Inzidenzgraphen gesammelt. In diesem Graphen fassen wir Zusammenhangskomponenten als Flussnetzwerke auf und trennen mit Hilfe eines Algorithmus zur Berechnung von minimalen Schnitten Knoten, die direkt oder indirekt miteinander verbunden sind und gleichzeitig aus der selben Sequenz kommen. Wurden alle dieser Mehrdeutigkeiten aufgelöst, ergibt sich als Zwischenstand eine Menge von partiellen Zuweisungsspalten. In diesen gibt es keine transitiven Mehrfachzuweisungen mehr, aber Überkreuzungen

6. Fazit

können weiterhin vorkommen.

Zur Entfernung von Stellen aus Zuweisungen, die für Inkonsistenzen sorgen, haben wir den Algorithmus von Pitschi kennengelernt. In einem Sukzessionsgraphen fügen wir die partiellen Zuweisungsspalten als Knoten ein, die miteinander verbunden sind, wenn es Sequenzen gibt, in denen Stellen der Knoten Nachfolger voneinander sind. Für jede Sequenz S_i konstruieren wir basierend darauf einen neuen Graphen in dem Ketten von Knoten auf einem Pfad vom Start- zum Endknoten einer Menge von konsistenten Zuweisungen bezüglich S_i entsprechen. Weil wir diese Menge maximieren möchten, wählen wir für jede Sequenz den Pfad maximaler Länge durch den entsprechenden Graphen.

Die resultierende Menge von konsistenten Zuweisungsspalten können wir wie zuvor bei DIALIGN in unseren Alignmentgraphen einfügen und danach auf den Teilsequenzen weitere Fragmente berechnen. Auch die Vorbereitung der Ausgabe erfolgt analog, nachdem sich das Alignment nicht mehr vergrößern lässt.

Aufgrund der begrenzten Zeit der Arbeit und dem großen Umfang konnte nicht das ganze Verfahren implementiert werden. Stattdessen wurde exemplarisch ein Algorithmus zur Bestimmung des längsten Pfades in der Programmiersprache C++ und mit Hilfe der Bibliothek *Boost Graph Library* umgesetzt. Dieser Algorithmus stellt einen wichtigen Schritt im Algorithmus von Pitschi dar, den wir zuvor auf einer höheren Abstraktionsebene betrachtet haben.

6.2. Weiterführen Arbeiten

Im Folgenden gehen wir auf mögliche Weiterentwicklungen des vorgestellten Verfahrens ein. Teilweise wurden diese bereits im Lauf der Bachelorarbeit vorgestellt, es fehlt aber noch eine Evaluierung der Ergebnisse mit Hilfe einer vollständigen Implementierung des Algorithmus. Andere potentielle Verbesserungen wurden hingegen noch nicht erwähnt.

[CPM10] haben festgestellt, dass die numerischen Scores ihres Verfahrens in vielen Fällen schlechter waren als die von DIALIGN 2.2, obwohl die Ergebnisse biologisch relevanter waren. Sie schlussfolgern daher, dass es auf Basis der aktuellen Gütefunktion keine substantielle Verbesserung des DIALIGN-Ansatzes mit Hilfe neuartiger Heuristiken mehr geben wird. Eine erste mögliche Verbesserung des Verfahrens könnten stochastische Ansätze für die Gütefunktion sein, wie beispielsweise *Conditional Random Fields* oder *Hidden Markov Models* [SM10, Edd95]. Außerdem könnte man statt paarweisen Alignments auch kleinere multiple Zuweisungen als Grundbausteine für die Heuristiken verwenden. Ein Ansatz sind zum Beispiel ternäre Alignments, bei denen sich Fragmente gleich über alle drei der betrachteten Sequenzen ziehen können. Leider sorgten sowohl die größere Anzahl dieser Alignments ($O(n^3)$ statt $O(n^2)$), als auch die höhere Laufzeit pro Tripel von Sequenzen (vermutlich etwa $O(L^3)$ statt $O(L^2)$) für eine insgesamt erheblich höhere Komplexität. Erst aufwändige Implementierungen eines darauf basierenden Verfahrens dürften zeigen, ob die zu erwartenden besseren Ergebnisse den Aufwand rechtfertigen.

[SNKM04] haben mit DIALIGN P eine parallelisierte Implementierung von DIALIGN entwickelt. Aber auch beim Min-Cut-Ansatz lassen sich viele Schritte des Algorithmus leicht parallelisieren:

1. Wie bei DIALIGN P kann man die voneinander unabhängigen paarweisen Alignments gleichzeitig berechnen.
2. Die Überlappgewichte lassen sich parallel bestimmen, wenn man für die Fragmente

- jedes paarweisen Alignments nur lesend auf die der anderen Alignments zugreift, bei denen eine der zwei selben Sequenzen beteiligt war.
3. Alle Schnitte sind voneinander unabhängig. Sie können also in jedem Durchlauf der while-Schleife für jede Zusammenhangskomponente im Inzidenzgraphen gleichzeitig berechnet werden.
 4. Für alle Sequenzen $S_i \in S$ können beim Algorithmus von Pitschi simultan die Graphen G_{S_i} konstruiert und die längsten Pfade bestimmt werden.

Auf diese Art und Weise ließe sich die mitunter sehr lange Laufzeit des graphtheoretischen Ansatzes vermutlich beträchtlich verringern.

Für den Algorithmus 3 habe ich einige Ansätze dafür gefunden, den benötigten Speicherplatz noch weiter zu verringern. Ein Beispiel ist die Verbesserung, dass nicht für jeden Endpunkt (i, j) alle dort endenden Fragmente gespeichert werden, sondern nur das, welches zum aktuellen Zeitpunkt das maximale Präfixgewicht hat. Die Speicherung aller Fragmente ist unnötig, weil später ohnehin nur das Maximum bestimmt wird.

Beim Konstruieren des Alignmentgraphen könnte man, anstatt zwei antiparallele Kanten zwischen den neu alignierten Stellen einzufügen, auch eine Verschmelzung von ihnen in einem Knoten durchführen. Das entspricht dann nicht genau dem Erhalt der transitiven Hülle auf einem Graph mit SSDP, weil die Pfade entlang jeder Sequenz durch den Graphen nicht mehr disjunkt sind. In der Praxis wäre das aber kein Problem, weil die Doppelkanten ohnehin für Verbindungen in beide Richtungen sorgen und die Knoten insofern äquivalent im Sinne der Funktion `EdgeAddition` sind. Das ist auch wenig überraschend, weil ein Alignment eine Äquivalenzrelation ist, in der alignierte Stellen Teil der selben Äquivalenzklasse sind. Man müsste in der Praxis testen wie sich der verringerte Speicherverbrauch durch die kleinere Anzahl an Kanten im Vergleich zu den zusätzlichen Kosten für die Vereinigung der ausgehenden Kanten auswirkt.

Wie Abschnitt 3.5.3 schon angedeutet könnte man die Felder `nextClass[]` und `prevClass[]` auch durch effizientere Datenstrukturen ersetzen. Es ließe sich viel Speicherplatz sparen, wenn man nicht für alle Waisen Vorgänger und Nachfolger speichert, sondern stattdessen für die Äquivalenzklassen an Waisen zwischen zwei alignierten Stellen. Denkbar wäre zum Beispiel eine Waldstruktur mit einem Suchbaum für jede Sequenz, der als Knoten Angaben über Start- und Endpunkte solcher Klassen enthält.

Im Abschnitt über den Algorithmus von Pitschi haben wir gezeigt, dass es Situationen geben kann, in denen die einfache Heuristik zum Löschen von Kanten im Graphen nicht das erwünschte Ergebnis liefert. Beim Versuch, die Zyklen im Graphen aufzulösen, kann es dazu kommen, dass auch eine Vielzahl an unbeteiligten Kanten gelöscht werden, im schlimmsten Fall sogar alle. Ein Beispiel für eine solche Situation sind Sequenzfamilien, bei denen es im Lauf der Evolution zu einer Permutation eines größeren Abschnitts gekommen ist. Um solchen Fällen vorzubeugen kann man beispielsweise überprüfen, ob die ursprüngliche Heuristik mehr als beispielsweise 25% aller Kanten löscht, und falls das der Fall ist, auf einen anderen Algorithmus wie den von [ELS93] zurückgreifen. Das wäre zwar zusätzlicher Aufwand, aber besser als die teuer berechneten partiellen Zuweisungsspalten nicht zu benutzen.

In Abschnitt 3.4 habe ich einen effizienten Algorithmus zum Berechnen der Überlappgewichte vorgestellt. Statt alle $O(n^2 \cdot L)$ Fragmente miteinander auf Überschneidungen zu überprüfen, werden nur Fragmente verglichen, an denen genau eine gemeinsame Sequenz beteiligt ist. Weil die Listen von Fragmenten nach dem Berechnen der paarweisen Alignments sortiert sind, lässt sich der Aufwand dafür weiter verringern, indem wir parallel

6. Fazit

über sortierte Listen traversieren.

Anstatt einheitliche Kapazitäten in den Flussnetzwerken über den Inzidenzgraphen zu benutzen, verwende ich Kapazitäten, die von der Ähnlichkeit der verbundenen Stellen abhängen. Das Kalkül dahinter ist, dass im Zweifelsfall eher unähnliche Symbole voneinander getrennt werden, anstelle von ähnlichen. Ob dieses Verfahren eine merkliche Verbesserung der Ergebnisse bewirkt muss man in der Praxis testen.

Diese potentiellen Verbesserungen werden in Zukunft genauer analysiert und implementiert. Es erscheint vielversprechend, dass sie eine Weiterentwicklung des DIALIGN-Verfahrens für das Multiple-Sequence-Alignment darstellen.

Literaturverzeichnis

- [Abd97] ABDEDDAÏM, S.: On Incremental Computation of Transitive Closure and Greedy Alignment. In: *Pattern Matching Algorithms*. Oxford University Press, 1997, S. 168–179
- [AKMO97] AHUJA, R. ; KODIALAM, M. ; MISHRA, A. ; ORLIN, J.: Computational investigations of maximum flow algorithms. In: *European Journal of Operational Research* 97:3 (1997), S. 509–542
- [AM00] ABDEDDAÏM, S. ; MORGENSTERN, B.: Speeding up the DIALIGN multiple alignment program by using the ‘Greedy Alignment of BIOlogical Sequences LIBrary’ (GABIOS-LIB). In: *Computational Biology: First International Conference on Biology, Informatics, and Mathematics*, 2000, S. 1–11
- [Cat17] Catch2. <https://github.com/catchorg/Catch2>, 2017
- [CHHE79] CUNNINGHAM, B. ; HEMPERLY, J. ; HOPP, T. ; EDELMAN, G.: Favin versus concanavalin A: Circularly permuted amino acid sequences. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* Bd. 76:7, Natl. Acad. Sci. USA, 1979, S. 3218–3222
- [CLRS09] CORMEN, T. ; LEISERSON, C. ; RIVEST, R. ; STEIN, C.: *Introduction to Algorithms*. 3rd. The MIT Press, 2009
- [CPM10] COREL, E. ; PITSCHI, F. ; MORGENSTERN, B.: A *min-cut* algorithm for the consistency problem in multiple sequence alignment. In: *Bioinformatics* 26:8 (2010), S. 1015–1021
- [Din06] DINITZ, Y.: Dinitz’ Algorithm: The Original Version and Even’s Version. In: *Theoretical Computer Science. Lecture Notes in Computer Science* Bd. 3895. Springer-Verlag, 2006
- [Edd95] EDDY, S.: Multiple alignment using hidden Markov models. In: *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol. 1995*, 1995, S. 114–120
- [ELS93] EADES, P. ; LIN, X. ; SMYTH, W.: A fast and effective heuristic for the feedback arc set problem. In: *Information Processing Letters* 47 (1993), S. 319–323
- [FF56] FORD, L. ; FULKERSON, D.: Maximal flow through a network. In: *Canadian Journal of Mathematics* 8 (1956), S. 399–404
- [GT88] GOLDBERG, A. ; TARJAN, R.: A new approach to the maximum-flow problem. In: *Journal of the ACM* 35:4 (1988), S. 921–940
- [GT14] GOLDBERG, A. ; TARJAN, R.: Efficient Maximum Flow Algorithms. In: *Communications of the ACM* 57:8 (2014), S. 82–89

- [HH92] HENIKOFF, S. ; HENIKOFF, J.: Amino acid substitution matrices from protein blocks. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* Bd. 89:22, Natl. Acad. Sci. USA, 1992, S. 10915–10919
- [Hir75] HIRSCHBERG, Daniel S.: A Linear Space Algorithm for Computing Maximal Common Subsequences. In: *Commun. ACM* 18 (1975), S. 341–343
- [KT05] KLEINBERG, J. ; TARDOS, E.: *Algorithm Design*. first. Pearson, 2005
- [MAHD98] MORGENSTERN, B. ; ATCHLEY, W. ; HAHN, K. ; DRESS, A.: Segment-based scores for pairwise and multiple sequence alignments. In: *ISMB-98 Proceedings, AAAI*, 1998, S. 115–121
- [MDW96] MORGENSTERN, B. ; DRESS, A. ; WERNER, T.: Multiple DNA and protein sequence alignment based on segment-to-segment comparison. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* Bd. 93, Natl. Acad. Sci. USA, 1996, S. 12098–12103
- [MFDW97] MORGENSTERN, B. ; FRECH, K. ; DRESS, A. ; WERNER, T.: DIALIGN: Finding local similarities by multiple sequence alignment. In: *Bioinformatics* 14:3 (1997), S. 290–294
- [Mor99] MORGENSTERN, B.: DIALIGN 2: improvement of the segment-to-segment approach to multiple sequence alignment. In: *Bioinformatics* 15:3 (1999), S. 211–218
- [Mor02] MORGENSTERN, B.: A Simple and Space-Efficient Fragment-Chaining Algorithm for Alignment of DNA and Protein Sequences. In: *Applied Mathematics Letters* 15:1 (2002), S. 11–16
- [MPDS06] MORGENSTERN, B. ; PROHASKA, S. ; D., Pöhler ; STADLER, P.: Multiple sequence alignment with user-defined anchor points. In: *Algorithms for Molecular Biology* 1:6 (2006)
- [NW70] NEEDLEMAN, S. ; WUNSCH, C.: A general method applicable to the search for similarities in the amino acids of two proteins. In: *Journal of Molecular Biology* 48 (1970), S. 443–453
- [PDC10] PITSCHI, F. ; DECHAUVELLE, C. ; COREL, E.: Automatic detection of anchor points for multiple sequence alignment. In: *BMC Bioinformatics* 11:445 (2010)
- [Pea13] PEARSON, W.: Selecting the Right Similarity Matrix. In: *Curr Protoc Bioinformatics* 43:3.5 (2013), S. 1–9
- [SKM08a] SUBRAMANIAN, A. ; KAUFMAN, M. ; MORGENSTERN, B.: *DIALIGN TX download*. <http://dialign-tx.gobics.de/download>, 2008. – Besuch: 2018-03-31
- [SKM08b] SUBRAMANIAN, A. ; KAUFMAN, M. ; MORGENSTERN, B.: DIALIGN TX: greedy and progressive approaches for segment-based multiple sequence alignment. In: *Algorithms for Molecular Biology* 3:6 (2008)
- [SLL00] SIEK, J. ; LEE, L. ; LUMSDAINE, A.: *Boost Graph Library*. <http://www.boost.org/libs/graph/>, 2000

- [SM10] SUTTON, C. ; MCCALLUM, A.: *An Introduction to Conditional Random Fields*. <https://arxiv.org/abs/1011.4088>, 2010. – Besucht: 2018-05-21
- [SNKM04] SCHMOLLINGER, M. ; NIESELT, K. ; KAUFMANN, M. ; MORGENSTERN, B.: DIALIGN P: Fast pair-wise and multiple sequence alignment using parallel processors. In: *BMC Bioinformatics* 5:128 (2004)
- [Szy10] SZYMASNKI, T.: *Multiple Sequence Alignment*. <http://www.summarization.com/~radev/767w10/papers/Week12/msa/msa.pdf>, 2010. – Besucht: 2018-05-07
- [TPP99] THOMPSON, J. ; PLEWNIAK, F. ; POCH, O.: BALiBASE: a benchmark alignment database for the evaluation of multiple alignment programs. In: *Bioinformatics* 15:1 (1999)
- [VS93] VINGRON, M. ; SIBBALD, P.: Weighting in sequence space: a comparison of methods in terms of generalized sequences. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* Bd. 90:19, Natl. Acad. Sci. USA, 1993, S. 8777–8781
- [WJ94] WANG, L. ; JIANG, T.: On the complexity of multiple sequence alignment. In: *Journal of Computational Biology* 4 (1994), S. 337–348

A. BLOSUM62

Die originale BLOSUM62 von Henikoff und Henikoff [HH92]:

	C	S	T	P	A	G	N	D	E	Q	H	R	K	M	I	L	V	F	Y	W
C	0	-1	1	0	2	1	1	2	1	2	0	0	2	4	1	5	1	2	-2	5
S		2	0	-2	0	-1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	-1	1	1	-1
T			2	-1	-1	-1	0	0	0	0	0	0	-1	0	-1	1	0	1	1	3
P				2	-2	-1	-1	0	0	-1	-1	-1	1	1	0	-1	0	0	2	1
A					2	-1	-2	-2	-1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	2
G						2	0	-1	-2	0	1	1	0	0	-1	0	-1	1	2	4
N							2	0	6	1	0	0	2	2	1	-1	0	0	2	2
D								2	6	0	-2	0	1	1	-1	0	0	1	3	3
E									2	5	2	-1	0	1	0	-1	0	1	2	2
Q										2	5	-1	-1	0	-1	1	0	1	3	-4
H											2	5	-1	-1	0	-1	1	0	1	3
R												2	5	-1	-1	0	1	2	4	M
K													2	5	-1	1	0	0	1	3
M														2	5	-1	0	-1	1	2
I															2	5	-1	0	1	2
L																2	5	-1	0	1
V																	2	5	-1	0
F																		2	5	-1
Y																			2	5
W																				2

FIG. 2. BLOSUM 62 substitution matrix (*Lower*) and difference matrix (*Upper*) obtained by subtracting the PAM 160 matrix position by position. These matrices have identical relative entropies (0.70); the expected value of BLOSUM 62 is -0.52 ; that for PAM 160 is -0.57 .

B. Beispiel der speichereffizienten Berechnung eines paarweisen Alignments

	$Sc[i, j]$		$Pr[i, j]$		ADGTCTCA GTCADCTCA
$i \backslash j$	0	1	0	1	Hier beginnende Fragmente und Kommentare
0	0	0	NIL	NIL	$F_2[4] = \{f_{4,2,2}, W(f) = 2, P(f) = \text{NIL}\}$ $F_3[5] = \{f_{5,3,3}, W(f) = 5, P(f) = \text{NIL}\}$
1	"	"	"	"	
2	"	"	"	"	
3	"	"	"	"	
4	"	"	"	"	
5	"	"	"	"	
6	"	"	"	"	
7	"	"	"	"	
8	"	"	"	"	

	$Sc[i, j]$		$Pr[i, j]$		ADGTCTCA GTCADCTCA
$i \backslash j$	1	2	1	2	Hier beginnende Fragmente und Kommentare
0	0	0	NIL	NIL	$F_3[5]$ wird nicht aktualisiert, da akt. Fragment größeres Präfixgewicht hat $F_4[8] = \{f_{4,8,3}, W(f) = 5, P(f) = \text{NIL}\}$
1	"	"	"	"	
2	"	"	"	"	
3	"	"	"	"	
4	"	2	"	$f_{4,2,2}$	
5	"	"	"	"	
6	"	"	"	"	
7	"	"	"	"	
8	"	"	"	"	

	$Sc[i, j]$		$Pr[i, j]$		ADGTCTCA GTCADCTCA
$i \backslash j$	2	3	2	3	Hier beginnende Fragmente und Kommentare
0	0	0	NIL	NIL	$F_4[8]$ wird nicht aktualisiert
1	"	"	"	"	
2	"	"	"	"	
3	"	"	"	"	
4	2	2	$f_{4,2,2}$	$f_{4,2,2}$	
5	"	5	"	$f_{5,3,3}$	
6	"	"	"	"	
7	"	"	"	"	
8	"	"	"	"	

B. Beispiel der speichereffizienten Berechnung eines paarweisen Alignments

	$Sc[i, j]$		$Pr[i, j]$		ADGTCTCA GTCADCTCA
$\begin{smallmatrix} j \\ i \end{smallmatrix}$	3	4	3	4	Hier beginnende Fragmente und Kommentare
0	0	0	NIL	NIL	$F_5[2] = \{f_{2,5,2}, W(f) = 2, P(f) = \text{NIL}\},$ $F_7[4] = \{f_{4,7,4}, W(f) = 4, P(f) = \text{NIL}\},$ $F_8[5] = \{f_{5,8,5}, W(f) = 7, P(f) = \text{NIL}\}$
1	"	"	"	"	
2	"	"	"	"	
3	"	"	"	"	
4	2	2	$f_{4,2,2}$	$f_{4,2,2}$	
5	5	5	$f_{5,3,3}$	$f_{5,3,3}$	
6	"	"	"	"	
7	"	"	"	"	
8	"	"	"	"	
	$Sc[i, j]$		$Pr[i, j]$		ADGTCTCA GTCADCTCA
$\begin{smallmatrix} j \\ i \end{smallmatrix}$	4	5	4	5	Hier beginnende Fragmente und Kommentare
0	0	0	NIL	NIL	$F_7[4]$ und $F_8[5]$ werden nicht aktualisiert bevorzuge $(i, j - 1)$ gegenüber $(i - 1, j)$
1	"	"	"	"	
2	"	2	"	$f_{2,5,2}$	
3	"	"	"	"	
4	2	"	$f_{4,2,2}$	$f_{4,2,2}$	
5	5	5	$f_{5,3,3}$	$f_{5,3,3}$	
6	"	"	"	"	
7	"	"	"	"	
8	"	"	"	"	
	$Sc[i, j]$		$Pr[i, j]$		ADGTCTCA GTCADCTCA
$\begin{smallmatrix} j \\ i \end{smallmatrix}$	5	6	5	6	Hier beginnende Fragmente und Kommentare
0	0	0	NIL	NIL	$F_7[6] = \{f_{6,7,2}, W(f) = 4, P(f) = f_{4,2,2}\},$ $F_8[7] = \{f_{7,8,3}, W(f) = 7, P(f) = f_{4,2,2}\}$ $F_9[8] = \{f_{9,8,4}, W(f) = 10, P(f) = f_{4,2,2}\}$
1	"	"	"	"	
2	2	2	$f_{2,5,2}$	$f_{2,5,2}$	
3	"	"	"	"	
4	"	"	$f_{4,2,2}$	$f_{4,2,2}$	
5	5	5	$f_{5,3,3}$	$f_{5,3,3}$	
6	"	"	"	"	
7	"	"	"	"	
8	"	"	"	"	
	$Sc[i, j]$		$Pr[i, j]$		ADGTCTCA GTCADCTCA
$\begin{smallmatrix} j \\ i \end{smallmatrix}$	6	7	6	7	Hier beginnende Fragmente und Kommentare
0	0	0	NIL	NIL	$F_8[7]$ und $F_9[8]$ nicht aktualisiert; Score erreicht, aber nicht übertroffen
1	"	"	"	"	
2	2	2	$f_{2,5,2}$	$f_{2,5,2}$	
3	"	"	"	"	
4	2	4	$f_{4,2,2}$	$f_{4,7,4}$	
5	5	5	$f_{5,3,3}$	$f_{5,3,3}$	
6	"	"	"	"	
7	"	"	"	"	
8	"	"	"	"	

	$Sc[i, j]$		$Pr[i, j]$		ADGTCTCA GTCADCTCA
$i \backslash j$	7	8	7	8	Hier beginnende Fragmente und Kommentare
0	0	0	NIL	NIL	$F_8[7]$ und $F_9[8]$ nicht aktualisiert; Score zwar erreicht, aber nicht übertroffen lösche $F_8[7]$, $F_9[8]$ wird nicht aktualisiert
1	"	"	"	"	
2	2	2	$f_{2,5,2}$	$f_{2,5,2}$	
3	"	"	"	"	
4	4	4	$f_{4,7,4}$	$f_{4,7,4}$	
5	5	7	$f_{5,3,3}$	$f_{5,8,5}$	
6	"	"	"	"	
7	"	"	"	"	
8	"	"	"	"	
	$Sc[i, j]$		$Pr[i, j]$		ADGTCTCA GTCADCTCA
$i \backslash j$	8	9	8	9	Hier beginnende Fragmente und Kommentare
0	0	0	NIL	NIL	
1	"	"	"	"	
2	2	2	$f_{2,5,2}$	$f_{2,5,2}$	
3	"	"	"	"	
4	4	4	$f_{4,7,4}$	$f_{4,7,4}$	
5	7	7	$f_{5,8,5}$	$f_{5,8,5}$	
6	"	"	"	"	
7	"	"	"	"	
8	"	10	"	$f_{9,8,4}$	

$f_0 = f_{\max} = Pr[8, 9] = f_{9,8,4}$, $f_1 = P(f_0) = f_{4,2,2}$ und zuletzt $f_2 = P(f_1) = \text{NIL}$. Das paarweise Alignment zwischen ADGTCTCA und GTCADCTCA sieht also wie folgt aus:

adGT---CTCA
--GTcadCTCA

Hierbei wurden alignierte Stellen großgeschrieben und als Zuweisungsspalten genau übereinander gereiht. Der Score des Alignments beträgt zehn, weil es zunächst ein kurzes Fragment mit zwei Übereinstimmungen gibt (Gewicht: $2 \cdot 3 + 0 \cdot (-1) - 4 = 2$) und dann ein längeres mit vier Übereinstimmungen (Gewicht: $4 \cdot 3 + 0 \cdot (-1) - 4 = 8$).

Algorithmenverzeichnis

1.	Algorithmus für die Berechnung des maximalen Scores zweier Sequenzen S_1 und S_2 unter Verwendung von Ähnlichkeitswerten α und Gap Penalty δ	6
2.	DIALIGN-Algorithmus zur Berechnung eines multiplen Alignments einer Menge von Sequenzen $S = \{S_1, \dots, S_n\}$	11
3.	Speichereffizientes paarweises DIALIGN	20
4.	Algorithmus EdgeAddition, der die transitive Hülle eines Graphen mit SSDP nach dem Hinzufügen einer Kante aktualisiert.	32
5.	Algorithmus zum Auflösen von Mehrdeutigkeiten in einem Inzidenzgraphen	55
6.	Algorithmus zum Berechnen eines längsten Pfads in einem Graphen G_{S_i}	64

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit über „*Ein graphtheoretischer Ansatz für das multiple sequence alignment-Problem*“ selbstständig verfasst worden ist, dass keine anderen Quellen und Hilfsmittel als die angegebenen benutzt worden sind und dass die Stellen der Arbeit, die anderen Werken – auch elektronischen Medien – dem Wortlaut oder Sinn nach entnommen wurden, auf jeden Fall unter Angabe der Quelle als Entlehnung kenntlich gemacht worden sind.

Vorname Nachname, Münster, 22. Mai 2018

Ich erkläre mich mit einem Abgleich der Arbeit mit anderen Texten zwecks Auffindung von Übereinstimmungen sowie mit einer zu diesem Zweck vorzunehmenden Speicherung der Arbeit in eine Datenbank einverstanden.

Vorname Nachname, Münster, 22. Mai 2018