



# **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, 18. Mai 2018



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Motivation</b>	<b>1</b>
1.1	Ablauf der Bachelorarbeit . . . . .	2
<b>2</b>	<b>Dynamische Programmierung und der Algorithmus von Needleman und Wunsch</b>	<b>3</b>
2.1	Dynamische Programmierung . . . . .	3
2.2	Der Algorithmus . . . . .	4
2.3	Komplexität . . . . .	8
<b>3</b>	<b>DIALIGN</b>	<b>11</b>
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 . . . . .	22
3.4	Überlappgewichte . . . . .	25
3.4.1	Umsetzung im Programm und Laufzeit . . . . .	26
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	Einbindung in DIALIGN . . . . .	37
3.5.4	Evaluation von DIALIGN mit der GABIOS-LIB . . . . .	37
3.5.5	Beispiel Konsistenzgrenzen . . . . .	38
3.6	Abschluss des Verfahrens . . . . .	41
3.6.1	Gesamtkomplexität . . . . .	42
3.7	Evaluiert, Zusammenfassung und Schwächen des Ansatzes . . . . .	43
3.7.1	Evaluiert . . . . .	43
3.7.2	Zusammenfassung . . . . .	43
3.7.3	Schwächen von DIALIGN . . . . .	44
<b>4</b>	<b>Ein Min-Cut-Ansatz für das Konsistenzproblem</b>	<b>47</b>
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> . . . . .	51

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	Mehrdeutigkeiten Auflösen . . . . .	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 . . . . .	59
4.3.3	Algorithmus zur Bestimmung des längsten Pfads . . . . .	62
4.3.4	Verankerungen . . . . .	64
4.3.5	Komplexität . . . . .	65
4.4	Abschluss und Zusammenfassung . . . . .	66
4.4.1	Beispiel . . . . .	66
4.4.2	Gesamtkomplexität . . . . .	67
4.4.3	Probleme bei der Heuristik zum Entfernen von Kanten . . . . .	67
4.4.4	Evaluierung . . . . .	68
<b>5</b>	<b>Programmierung</b>	<b>71</b>
<b>6</b>	<b>Fazit</b>	<b>73</b>
6.1	Zusammenfassung . . . . .	73
6.2	Future Works . . . . .	74

# 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

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 ein Prinzip zum algorithmischen Lösen eines Optimierungsproblems. 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 Teilprobleme zerlegt wird, statt in sich überlappende [CLRS09, S.359]. Denken wir beispielsweise an Mergesort zurück: hier sortiere ich ein Feld, indem ich immer größer werdende disjunkte Teilfelder miteinander verschmelze.

In der Regel stellt man bei der dynamischen Programmierung zunächst eine Rekursionsgleichung auf mit deren Hilfe sich das Problem beschreiben lässt. Im Gegensatz zur 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.

Dynamische Programmierung wurde in den 1940er-Jahren von Richard Bellman in Stanford und später bei der Denkfabrik RAND Corporation entwickelt. Nach ihm ist auch das *Bellmannsche Optimalitätsprinzip* benannt, das besagt, dass man bei vielen Optimierungsproblemen die optimalen Lösungen von Teilproblemen benutzen kann, um die

optimale Lösung des eigentlichen Problems zu berechnen. Warum Bellman den Begriff „dynamische Programmierung“ gewählt hat, ist unklar. In seiner Autobiographie „Eye of the Hurricane“ erklärt er [Bel84, S.159]:

An interesting question is, Where did the name, dynamic programming, come from? The 1950s were not good years for mathematical research. We had a very interesting gentleman in Washington named Wilson. He was Secretary of Defense, and he actually had a pathological fear and hatred of the word research. I'm not using the term lightly; I'm using it precisely. His face would suffuse, he would turn red, and he would get violent if people used the term research in his presence. You can imagine how he felt, then, about the term mathematical. The RAND Corporation was employed by the Air Force, and the Air Force had Wilson as its boss, essentially. Hence, I felt I had to do something to shield Wilson and the Air Force from the fact that I was really doing mathematics inside the RAND Corporation. What title, what name, could I choose? In the first place I was interested in planning, in decision making, in thinking. But planning, is not a good word for various reasons. I decided therefore to use the word "programming". I wanted to get across the idea that this was dynamic, this was multistage, this was time-varying. I thought, let's kill two birds with one stone. Let's take a word that has an absolutely precise meaning, namely dynamic, in the classical physical sense. It also has a very interesting property as an adjective, and that is it's impossible to use the word dynamic in a pejorative sense. Try thinking of some combination that will possibly give it a pejorative meaning. It's impossible. Thus, I thought dynamic programming was a good name. It was something not even a Congressman could object to. So I used it as an umbrella for my activities.

Ob diese Geschichte wirklich war ist, ist fraglich, denn die erste Arbeit Bellmans, die den Begriff benutzt, wurde bereits 1952 veröffentlicht, obwohl der oben genannte Charles Wilson erst ein Jahr später Verteidigungsminister wurde. Anderen Aussagen zufolge wurde der Begriff analog zur linearen Programmierung von George Dantzig gewählt, dem Erfinder des Simplex-Verfahrens [Kus04]. Dieser war ungefähr zur selben Zeit bei RAND beschäftigt. Das Adjektiv „dynamisch“ bezieht sich dabei auf die künstliche Einfügung von Zeit in ein statisches Problem [Bel57, S. xi]. Genauer gesagt ist damit gemeint, dass die Reihenfolge der Durchführung von Berechnungen von Bedeutung ist: zunächst müssen die optimalen Lösungen der sich überlappenden Teilprobleme berechnet werden, bevor ich diese zur optimalen Lösung des eigentlichen Problems zusammensetzen kann.

### 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 informaleren 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 (Needleman-Wunsch))

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 überkreuzten 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  $\alpha_{s,t}$  zu, abhängig von der Ähnlichkeit der beiden Symbole. Oft wird hier nur zwischen Übereinstimmungen und Abweichungen unterschieden, aber in manchen Kontexten wie beispielsweise Proteinsequenzen mag es auch andere Möglichkeiten geben. Genauer widmen wir uns diesem Thema in Abschnitt 3.2.2. Wird hingegen eine Lücke in eine der beiden Sequenzen eingefügt, dann ziehen wir dann Kosten in der Höhe  $\delta$  ab (sog. *Gap Penalty*).

**2.2.2 Definition** (Score (Needleman-Wunsch))

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

$$\text{score}(\mathcal{R}, S_1, S_2) := \sum_{(s,t) \in \mathcal{R}} \alpha_{s,t} - \sum_{s: \nexists t: (s,t) \in \mathcal{R}} \delta - \sum_{t: \nexists s: (s,t) \in \mathcal{R}} \delta \quad (2.1)$$

Der Score ist für ein Alignment beim Algorithmus von Needleman-Wunsch also als die Summe aller *Ähnlichkeitswerte* von einander zugewiesenen Symbolen der beiden Sequenzen definiert, von denen die Gap Penalties aller eingefügten Lücken abgezogen werden. Das Ziel wird es jetzt sein eine Rekursionsgleichung aufzustellen mit deren Hilfe man diesen 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 gilt  $\alpha_{i,j} = 1$  für  $i \neq j$  und  $\alpha_{i,i} = 0$ , sowie  $\delta = 2$ .

<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  $2 \cdot 1 - 2 = 0$ . 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 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. 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, weil es später bei DIALIGN auch darum gehen wird den (dort leicht anders definierten) Score zu maximieren.

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 das nicht der Fall ist. Diese Aussage gilt aber auch für alle Teilsequenzen, die nicht über die ganze gehen und das bietet uns einen Ansatz für die dynamische Programmierung.

### 2.2.3 Lemma

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 gilt  $(i, m) \in \mathcal{R}$  und  $(n, j) \in \mathcal{R}$ . Dann überkreuzen sich diese beiden Zuweisungen und das ist ein Widerspruch zu unserer 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.  $\nexists j \in \{1 \leq j < m\}$  mit  $(n, j) \in \mathcal{R}$  -  $S_1[n]$  ist nicht zugewiesen
3.  $\nexists i \in \{1 \leq i < n\}$  mit  $(i, m) \in \mathcal{R}$  -  $S_2[m]$  ist nicht zugewiesen

Sei  $OPT(i, j)$  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 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 einen anderen Sequenz eine Lücke eingefügt werden.

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

$OPT$  lässt sich dann maximieren, indem man über die drei möglichen Fälle das Maximum berechnet. Damit ergibt sich auch die Rekursionsgleichung, die wir dann zur Berechnung des optimalen Scores der ganzen Sequenzen mit dynamischer Programmierung benutzen können. 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  $OPT(i, j)$  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  $OPT(i, j)$  der Teilsequenzen bis zu den Indizes  $i$  und  $j$ :

$$\begin{aligned} OPT(i, j) &= \max\{OPT(i-1, j-1) + \alpha_{S_1[i], S_2[j]}, OPT(i-1, j) - \delta, OPT(i, j-1) - \delta\} \\ OPT(i, 0) &= i \cdot \delta \\ OPT(0, j) &= j \cdot \delta \end{aligned} \tag{2.2}$$

Diese Rekursionsformel können wir direkt in einem Algorithmus münden lassen. Wie man sieht ist dieser 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  $\alpha$  und Gap Penalty  $\delta$

---

```

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

```

---

Bis jetzt 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 kann ich  $(i-1, j-1)$  zum Alignment hinzufügen. 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.

Noch ein kleines Beispiel mit einer Tabelle?

### 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  $O(n \cdot)$  Speicherplatz berechnet werden.

*Beweis.* Die Korrektheit des Algorithmus 1 folgt aus der Korrektheit der Rekursionsgleichung. 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.  $\square$

### 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  $O(n \cdot)$  Speicherplatz berechnet werden.

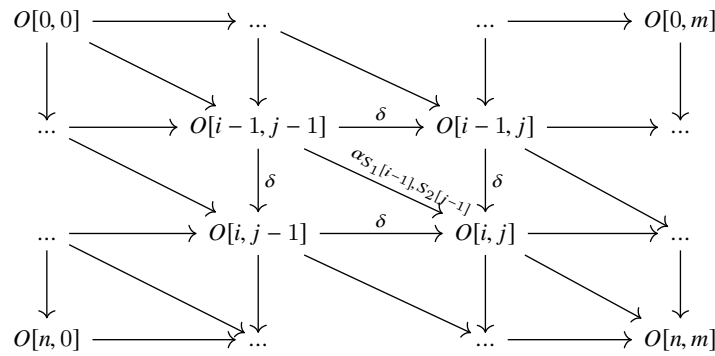
*Beweis.* Wie zuvor gezeigt kann in der selben Zeit- und Speicherkomplexität der Score eines optimalen Alignments berechnet werden. Mit einem einfachen Backtrackingprozess kann man jetzt feststellen, welche Zuweisungen Teil eines dazugehörigen Alignments sind. Dafür betrachte ich wie oben beschrieben 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  $O(n + m)$  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-Wunsch mit Hilfe eines *Divide-and-Conquer*-Ansatzes in  $O(n + m)$  Speicherplatz umsetzt [Hir75]. Diese Verbesserung kann bei langen Sequenzen einen großen Unterschied in der Laufzeit machen, weil es zu weniger Seitenfehlern kommt. Auf diesen Algorithmus möchte ich hier nicht weiter eingehen, aber wir werden im kommenden Kapitel einen ähnlichen Algorithmus zum speicherplatzeffizienten berechnen von segmentbasierten paarweisen Alignments kennenlernen.

## 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 Algorithmus von Needleman-Wunsch anschaulich motivieren.

Man kann die Modellierung nach Needleman-Wunsch auch als Graphen interpretieren, bei dem der Algorithmus einen längsten Pfad durch diesen Graphen findet. 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 von einer Menge  $S = \{S_1, \dots, S_n\}$  von Sequenzen erweitern. Dazu benötigt man dann aber eine  $n$ -dimensionale Matrix mit  $l_1 \cdot \dots \cdot l_n$  Einträgen, wobei  $l_i$  die Länge der Sequenz  $S_i$  ist, beziehungsweise einen Graphen mit derselben Anzahl an Knoten. Setzt man  $l_{\max} := \max\{l_1, \dots, l_n\}$ , dann muss man  $O(l_{\max}^n)$  Einträge der Matrix berechnen. Durch die höhere Anzahl an Sequenzen steigen auch die Kosten für die Berechnung eines einzelnen Eintrags. Betrachten wir beispielsweise die Berechnung eines Eintrages der Tabelle für drei Sequenzen. In diesem Schritt habe ich die Möglichkeit in keine der Sequenzen eine Lücke einzufügen und alle drei Symbole miteinander zu alignieren (1 Möglichkeit), in eine der Sequenzen eine Lücke einzufügen (3 Möglichkeiten) oder in zwei der Sequenzen eine Lücke einzufügen (3 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. [WJ94] haben formal bewiesen, dass es nicht möglich ist unter angemessenen Einschränkungen ein multiples Alignment in deterministisch polynomieller Zeit zu berechnen. Das *Multiple-Sequence-Alignment*-Problem ist somit *NP-schwer* mit der Komplexität  $O(n^l)$ .

Aufgrund dieser Erkenntnis ist es 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 Needleman-Wunsch zu benutzen. Stattdessen sind wir dazu gezwungen Heuristiken zu entwickeln, die in angemessener Zeit eine möglichst gute Annäherung an das perfekte Ergebnis liefern. Mit DIALIGN von [MDW96] und der graphtheoretischen Erweiterung von [CPM10] werden wir dafür zwei leistungsstarke Heuristiken kennenlernen und analysieren.



### 3 DIALIGN

In diesem Kapitel stelle ich zunächst das DIALIGN-Verfahren für multiples Sequenzalignment nach [MDW96] vor. Dabei werde ich alle Anpassungen und Verbesserungen des Verfahrens vorstellen, die bis zur Version 2.2 umgesetzt wurden. Anders als der im letzten Kapitel vorgestellte Algorithmus von Needleman-Wunsch aligniert DIALIGN keine einzelnen Symbole, sondern gleich ganze Segmente der Eingabesequenzen. Das hat die Vorteile, dass man zum einen auf die Kosten zum Einfügen von Lücken verzichten kann und dadurch weitgehend von benutzerdefinierten Eingaben unabhängig wird, und weiterhin ist man so in der Lage sowohl global, als auch lokal verwandte Sequenzen einander auszurichten: Wenn man feststellt, dass in einem Bereich keine Segmente vorliegen, 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 effizient multiple Alignments berechnen, die aus drei oder mehr Sequenzen bestehen. Das grobe Vorgehen sieht dabei wie folgt aus:

---

**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  $f_{1,\dots,n}$ 
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:        $A \cup \{f_i\}$  ▷ 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. Dazu betrachten wir im Folgenden eine  $n$ -stellige Menge von Sequenzen  $S$  über einem endlichen Alphabet. Dabei gibt  $L_i$  die Länge der  $i$ -ten Sequenz an.

#### 3.1.1 Definition (Stelle und Stellenraum)

Eine *Stelle* ist ein Tupel  $(i, p)$ , bei dem  $i$  die Sequenz und  $p$  die Position eines Zeichens innerhalb dieser Sequenz angibt. Als *Stellenraum* bezeichnen wir die Menge aller Stellen über unseren Sequenzen  $S$ :  $\mathcal{S} := \{(i, p) | 1 \leq i \leq n, 1 \leq p \leq L_i\}$

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  $p \leq p'$ .

Nachdem wir bis jetzt nur umgangssprachlich mit Alignments und *Konsistenz* zu tun hatten, möchte ich diese Begriffe nun formalisieren.

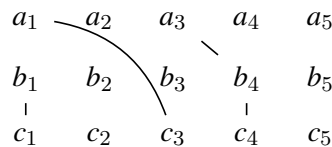
#### 3.1.2 Definition (Alignment und Konsistenz)

Ein *Alignment*  $\mathcal{A}$  ist eine Äquivalenzrelation auf der Menge  $\mathcal{S}$ , die ein bestimmtes *Konsistenzkriterium* erfüllt. Sei zunächst  $\mathcal{R}$  eine beliebige binäre Relation auf  $\mathcal{S}$ . 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  $\mathcal{X}_t$  die transitive Hülle einer Relation  $\mathcal{X}$ .

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  $x, y \in S_i \forall 1 \leq i \leq n$  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  $(x, y) \in \mathcal{S}^2$  *konsistent* mit einer Relation  $\mathcal{R}$ , falls  $\mathcal{R} \cup \{(x, y)\}$  *konsistent* ist.

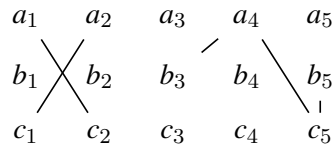
Für ein Alignment  $\mathcal{A}$  und  $(x, y)$  gilt  $x \mathcal{A} y$  genau dann, wenn die Stellen  $x$  und  $y$  durch  $\mathcal{A}$  aligniert werden oder identisch sind.

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.



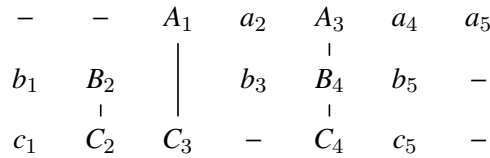
Für alle Stellen, die aus der selben Sequenz stammen, gilt  $x \leq_{\mathcal{R}} y \implies x \leq y$ , wie beispielsweise für  $a_1$  und  $a_5$ :  $a_1 \mathcal{A} c_3$ ,  $c_3 \leq c_4$ ,  $c_4 \mathcal{A} b_4$ ,  $b_4 \mathcal{A} a_3$  und  $a_3 \leq a_5$ . Es folgt  $a_1 \leq_{\mathcal{R}} a_5$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





Hier 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 erstens Sequenz nicht. Der Grund liegt hier an der 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 gerade die einander zugewiesenen 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. Bei unserem ersten Beispiel 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)

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  $S_1[i - k] \mathcal{A} S_2[j - k] \forall 0 \leq k \leq l - 1$  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

### 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]. Gegeben sei ein Fragment  $f$  der Länge  $l$ , mit  $m$  in beiden Sequenzen übereinstimmenden Symbolen. Dann lautet die Wahrscheinlichkeit, dass ein solches Fragment der Länge  $l$   $m$  oder mehr Übereinstimmungen hat wie folgt:

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

Wie in anderen Disziplinen, wie der Informationstheorie oder statistischen Mechanik benutzen wir als Gewichtsfunktion nun den negativen Logarithmus von  $P(l, m)$ . Dadurch bekommen wir 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 als Score des Alignments.

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

### 3.2.2 Substitutionsmatrizen

Es hat sich jedoch 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].

Deswegen verwenden wir genau wie bei Needleman-Wunsch Substitutionsmatrizen, wie beispielsweise BLOSUM62, um die Ähnlichkeit zwischen zwei Fragmenten zu berechnen. Sei dazu  $f_{i,j,l}$  ein Fragment aus den zwei Sequenzen  $S_1$  und  $S_2$  und  $M$  eine Substitutionsmatrix. Dann berechnet folgende Formel das Gewicht von  $f_{i,j,l}$ :

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

Dieses Vorgehen hat einige Vorteile gegenüber der alten Gewichtsrechnung. Zum einen kann man das Gewicht eines Fragments  $f_{i,j,l}$  sehr einfach berechnen, wenn man das Gewicht des Fragments  $f_{i-1,j-1,l-1}$  bereits kennt, indem man einen einzigen Ähnlichkeitswert zur Summe hinzu addiert. Zum anderen kann man die Berechnung vieler Gewichte frühzeitig abbrechen und zwar, 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 anguckte, 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 Wahrscheinlichkeit, mit der die beiden Aminosäuren auftreten  $q_i$  und  $q_j$ , sowie die Wahrscheinlichkeit, dass gerade diese beide Aminosäuren miteinander aligniert werden  $p_{i,j}$ .

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

Der Korrekturterm  $\lambda$  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 und die Wahrscheinlichkeit für eine längere Folge aufeinanderfolgender Paare wird mit der Summe der Einträge berechnet. Das funktioniert aufgrund der Rechenregeln des Logarithmus:  $\log(p_1 \cdot p_2) = \log(p_1) + \log(p_2)$ . Möchte man die ursprünglichen Wahrscheinlichkeiten berechnen, muss man lediglich die Summe der Ähnlichkeitswerte exponentieren.

[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.

#### BLOSUM62

BLOSUM62 IM ANHANG???

Bei DNA wird meistens nur eine simple Unterscheidung zwischen Treffern und Nichttreffern gemacht. Als Substitutionsmatrix entspräche dies der Einheitsmatrix. Dies hat aber die Nachteile, 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 [Pea13] sind die Ähnlichkeiten zwischen zu vergleichenden DNA-Sequenzen deutlich größer, als bei Proteinen. 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. Dementsprechend können +1/-3 für Treffer und Nichttreffer bei 99%, +2/-3 bei 90% und +5/-4 bei 70% Übereinstimmung benutzt werden.

Ich muss jedoch zugeben, dass die Wahl der richtigen Substitutionsmatrix ein bisschen dem Henne-Ei-Problem ähnelt: um die Ähnlichkeit von zwei Sequenzen zu bestimmen,

müssen wir sie mit der passenden Matrix alignieren. Für die Wahl dieser Matrix 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 in DIALIGN TX, der neuesten Version des Programms wie wir sie auf der Website der Göttinger Bioinformatik finden [SKM08], wird diese Technik jedoch angewendet. 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 noch 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. Denn für ein gutes Alignment ist es genauso wichtig, dass nicht miteinander verwandte Abschnitte einander auch nicht zugewiesen werden, wie es wichtig ist, dass dies bei verwandten getan wird. Bei Tests mit DIALIGN 1 hat man jedoch festgestellt, dass ein Großteil der ausgewählten Fragmente nur knapp über der Gewichtsgrenze  $T$  lagen und wenn man diese senkte, sank das Gewicht der Fragmente auch [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 man  $f$  in diese teilt. Das sorgt dafür, dass man oft bessere Scores erhält, wenn man größere Fragmente aufteilt und dazwischen einzelne Regionen mit geringen Übereinstimmungen weglässt, statt große Fragmente 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  $P(l, m)$ , 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 man eine Substitutionsmatrix benutzt, die einem zufälligen Fragment im Schnitt ein negatives Gewicht zuordnet, werden wir später

nach der Programmierung empirisch feststellen. Möglicherweise ist es dann besser auf ihn zu verzichten. Mit einer  $(+2/-3)$ -Matrix haben wir beispielsweise einen 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 beziehe ich mich, 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.

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

#### 3.3.1 Satz

Mit der obigen Rekursionsgleichung 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 von Fragmenten bezeichnet, die mit  $f$  endet.

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

### 3.3.2 Definition (Vorgänger)

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, 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 zwar strenggenommen nicht wohldefiniert und es könnte mehrere Fragmente mit diesen Eigenschaften geben. Wie auch schon in [MDW96] wählen wir dann das in den Sequenzen am weitesten rechts stehende aus.

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

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 (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.

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

Analog zu den Fällen von  $W(f)$  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.

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

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 Backtracking-Algorithmus 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.

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

#### 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. 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 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 [Mor02], die durch  $|F|$  begrenzt wird.

Wir gehen unsere Scorematrix Spalte für Spalte von links nach rechts durch. An jeder Position  $(i, j)$  berechnen wir 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. Dabei speichern wir Pointer 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  $L_1$ .

**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

```

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, dass es Teil der optimalen Kette von Fragmenten ist. Sollte  $Pr[i, j]$  nicht in  $(i, j)$  enden, können wir sogar alle Einträge aus  $F_j$  löschen, die in Zeile  $i$  enden.



### 3.3 Paarweise Alignments mit dynamischer Programmierung

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. Wenn die Teilsumme von Ähnlichkeitswerten bis zu einem bestimmten Punkt negativ, können wir den Durchlauf von 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 vielleicht ist es Teil eines größeren, das Teil des finalen Alignments sein kann.
- 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: Wenn das Residuenpaar direkt hinter dem Ende des aktuellen Fragments einen positiven Ähnlichkeitswert hat. Das bedeutet, 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 3.7 keins 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 gibt. In diesem Fall brauchen wir aber das andere

Guckt man sich 3.12 genauer an, stellt man fest, dass man gar nicht alle Fragmente 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 3.12 eintritt und erst dann in 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. 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 Spalteneintrag gesichert, indem wir in  $Pr[i, j]$  einen Pointer auf das letzte Fragment einer optimalen Kette für die Teilsequenzen bis zu den Stellen  $i$  und  $j$  in den beiden Sequenzen speichern. 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. Und 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

Ein paarweises optimales Alignment zwischen zwei Sequenzen  $S_1$  und  $S_2$  mit Längen  $L_1$  und  $L_2$ , gegeben eine maximale Fragmentlänge  $l_{\max}$ , 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 *Vorgänger* und *Präfixgewichte*, sowie das Speichern in  $F_j$ , der in  $(i, j)$  startenden Fragmente benötigt jeweils  $O(1)$  Zeit, da ihre Länge durch  $l_{\max}$  beschränkt ist.  $Sc[i, j]$  und  $Pr[i, j]$  lassen sich auch 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 Pointerkette von *Vorgänger* zu *Vorgänger* folgen müssen, bis wir am Anfang der Sequenzen angelangt sind. Es 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, kommen wir für die paarweisen Alignments insgesamt auf eine Laufzeit von  $O(n^2 \cdot L^2)$

#### 3.3.3 Beispiel zur Berechnung paarweiser Alignments

Um das 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 unseres Algorithmus 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.

Habt ihr eine Idee wie man dieses monströse Beispiel halbwegs schön vermitteln kann? Ich habe erstmal alles hier so reingeklatscht, das kann ich nachher auch noch (teilweise) in den Anhang auslagern.

### 3.3 Paarweise Alignments mit dynamischer Programmierung

		$Sc[i, j]$		$Pr[i, j]$		ADGTCTCA GTCADCTCA
i	j	0	1	0	1	Hier beginnende Fragmente und Kommentare
0	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	j	1	2	1	2	Hier beginnende Fragmente und Kommentare
0	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	j	2	3	2	3	Hier beginnende Fragmente und Kommentare
0	0	0	0	NIL	NIL	$F_4[8]$ wird nicht aktualisiert  $F_5[2] = \{f_{2,5,2}, W(f) = 2, P(f) = \text{NIL}\}$ , $F_7[4] = \{f_{4,7,4}, W(f) = 4, P(f) = \text{NIL}\}$ , $F_8[5] = \{f_{5,8,5}, W(f) = 7, P(f) = \text{NIL}\}$
1	"	"	"	"	"	
2	"	"	"	"	"	
3	"	"	"	"	"	
4	2	2	$f_{4,2,2}$	$f_{4,2,2}$	$f_{4,2,2}$	
5	"	5	"	$f_{5,3,3}$	$f_{5,3,3}$	
6	"	"	"	"	"	
7	"	"	"	"	"	
8	"	"	"	"	"	
		$Sc[i, j]$		$Pr[i, j]$		ADGTCTCA GTCADCTCA
i	j	3	4	3	4	Hier beginnende Fragmente und Kommentare
0	0	0	0	NIL	NIL	$f_{5,3,3}$ statt $f_{8,4,3}$ , wähle vorderes Fragment bei Gleichstand; lösche $f_{8,4,3}$ aus $F_4[8]$
1	"	"	"	"	"	
2	"	"	"	"	"	
3	"	"	"	"	"	
4	2	2	$f_{4,2,2}$	$f_{4,2,2}$	$f_{4,2,2}$	
5	5	5	$f_{5,3,3}$	$f_{5,3,3}$	$f_{5,3,3}$	
6	"	"	"	"	"	
7	"	"	"	"	"	
8	"	"	"	"	"	

### 3 DIALIGN

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

		$Sc[i, j]$		$Pr[i, j]$		ADGTCTCA GTCADCTCA
i \ 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. Dies sind die Ergebnisse der anderen Alignments:

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

### 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. Hat man erstmal diese verwandten Abschnitte 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 es sein kann, dass sie im Vergleich zu zufälligen Übereinstimmungen klein sind. Dann bekommen diese 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 gewichteten Zuweisungen zu ihnen inkonsistent sind.

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. Dann kann es 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 man jedoch die Zusammensetzung der Sequenzen stärker beachten. Hat man nämlich eine große Subfamilie von sehr ähnlichen Sequenzen, 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 Umsetzung im Programm und Laufzeit

Bei DIALIGN werden naiv alle Fragmente der paarweisen Alignments miteinander verglichen und auf Überschneidungen untersucht. 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].

Untersucht man das Problem jedoch genauer, stellt man fest, dass man für ein Fragment  $f^{k,l}$  gar nicht alle Fragmente auf Überlappungen überprüfen muss, 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 wir können in sortierten Fragmentketten durch die Start- und Endpunkte sehr genau abschätzen welche für Überlappungen in Frage kommen.

#### 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 gehen davon aus, dass der vorherige Schritt unseres Verfahrens diese in einer Tabelle  $A$  gespeichert hat, wobei  $A_{i,j}$  die Fragmente des paarweisen Alignments zwischen  $S_i$  und  $S_j$  in einer sortierten Liste enthält. Das können wir o.B.d.A. annehmen, weil der Algorithmus diese ohnehin in sortierter Reihenfolge berechnet.

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  $O(n^3 \cdot L)$ .  $\square$

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 man sich beim obigen Algorithmus noch die Hälfte des Aufwands sparen, denn die *Überlappgewicht* zwischen  $A_{i,k}$  und  $A_{k,j}$  müssen wir nicht doppelt berechnen, sondern können sie gleich zu den Gewichten in beiden Alignments addieren. Obgleich das nichts an der asymptotischen Laufzeit ändert, macht es in der Praxis einen Unterschied.

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

### 3.4.2 Beispiel Überlappgewichte

Widmen wir uns den *Überlappgewichten* an 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.

Da unsere Tabelle nicht vollständig ist, reicht es nicht die Einträge der selben 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 gucken 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.

Zur Erinnerung hier nochmal der bisherige Stand mit den paarweisen Alignments:

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

### 3 DIALIGN

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

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 Anweisungen auch mit und zwischen allen anderen Alignments durchführen, kommen wir zu den folgenden *Überlappungsgewichten*:

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				

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 früher gewählt werden und wir sie selbst dann nicht wieder aus unserem multiplen Alignment entfernen, wenn sie durch Inkonsistenzen verhindern, dass andere, zusammen möglicherweise bessere Fragment gewählt werden können. Durch diese radikale Vorgehensweise haben gierige Algorithmen oft gute Laufzeiten, liefern aber nicht immer die bestmöglichen Ergebnisse. Zu bekannten Vertretern dieses Paradigmas gehören beispielsweise der Algorithmus von Dijkstra zur Bestimmung der kürzesten Pfade aus einem einzelnen Knoten oder die Algorithmen von Prim und Kruskal zur Bestimmung von minimalen Spannbäumen.

## 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 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 monoton wachsende Menge  $A_1 \subset \dots \subset A_k$ :

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

Das finale Alignment  $\mathcal{A}$  ist dann genau das resultierende größte Alignment  $\mathcal{A}_k$ . Die Frage, die man sich natürlich jetzt stellt, lautet: „Wie kann ich bestimmen, ob ein Fragment konsistent zu einem Alignment ist?“ Und noch besser: „Wie kann ich das effizient bestimmen?“

### 3.5.1 Definition (Konsistenzgrenze)

Gegeben seien ein Alignment  $\mathcal{A}$  auf einer Menge von Sequenzen  $S$  mit Stellenraum  $\mathcal{S}$ . Dann existiert 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.

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

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 bedeutete benötigten Speicherplatz 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 Gesamtlaufzeit des DIALIGN-Verfahrens dominiert hat [Mor99].

Weil die Laufzeit im Vergleich zu anderen Verfahren, 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 ließ [AM00].

### 3.5.2 Definition (Transitivitätsgrenzen)

Die sogenannten *Transitivitätsgrenzen* erlauben es uns die Konsistenzgrenzen als graphtheoretisches Problem zu verstehen. Wir definieren zu unserer Stelle  $s$  die *Vorgängergrenze*  $Pred_{\mathcal{A}}(s, i)$  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*  $Succ_{\mathcal{A}}(s, i)$  als

am weitesten links stehende Stelle mit  $s \leq_{\mathcal{A}} y$  festgelegt.

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

Zwischen *Transitivitäts*- und Konsistenzgrenzen herrscht ein direkter Zusammenhang. Ist unsere Stelle  $s$  bereits mit einer anderen aus der Sequenz  $S_i$  aligniert, dann gibt es zwischen allen vier Grenzen keinen Unterschied.

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

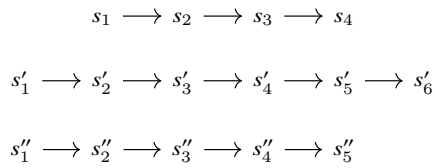
Gibt es hingegen keine Stelle in  $S_i$ , die bereits  $s$  zugewiesen wurde, dann unterscheiden sich  $\text{Pred}_{\mathcal{A}}(s, i)$  und  $\underline{b}_{\mathcal{A}}(s, i)$ , sowie  $\text{Succ}_{\mathcal{A}}(s, i)$  und  $\bar{b}_{\mathcal{A}}(s, i)$  jeweils nur um genau eine Position.

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

Man kann also sagen, dass *Transitivitäts*grenzen und Konsistenzgrenzen äquivalent sind, denn wenn man das aktuelle Alignment kennt, kann man aus dem einen das jeweils andere bestimmen. Daraus folgt auch, dass man mit beiden darstellen kann, ob zwei Stellen miteinander alignierbar sind oder nicht.

Beispiel hinzufügen?

In den nächsten beiden Abschnitten zeige ich eine Technik mit der man in konstanter Zeit entscheiden kann, ob zwei Stellen miteinander alignierbar sind und einen inkrementellen Algorithmus, der es uns in angemessener Zeit erlaubt ein Alignment zwischen zwei Stellen in unser multiples Alignment hinzuzufügen.



**Abbildung 3.1:** Graph dreier Sequenzen mit den durch sie induzierten Pfaden

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.

### 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  $(v_i, v_{i+1}) \in E \forall 1 \leq i \leq k-1$ , 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  $G$  ist der Graph  $G^*$ , in dem es eine Kante  $(u, v) \in E^*$  gibt, falls es in  $G$  einen Pfad von  $u$  nach  $v$  gibt. Sollte es  $(u, v) \in E^*$  geben, dann nennen wir  $u$  den Vorgänger von  $v$  und  $v$  den Nachfolger von  $u$ . Diese Vorgänger und Nachfolger

sind nicht mit den gleichnamigen Definitionen aus dem Abschnitt über die paarweisen Alignments zu verwechseln. Ich habe mich hier an den Begriffen der Quellen orientiert, die den selben Begriff an verschiedenen Stellen verwenden. Da die beiden Bedeutungen des Begriffs aber nur in zueinander disjunkten und klar getrennten Themengebieten vorkommen, hoffe ich hier nicht allzu viel Verwirrung zu stiften.

Zunächst definieren wir ein paar 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  $\mu_0$ , die sich vor dem Hinzufügen von neuen Verbindungen in unserem Graphen befinden. Zuletzt brauchen wir noch  $\mu_p$  für die Anzahl der Kanten, über die ein Pfad  $P$  traversiert.

Sei im Folgenden eine Menge  $\mathcal{P} = \{P_1, \dots, P_k\}$  von Pfaden auf unserem ursprünglichen Graphen 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. Man kann sich vorstellen, dass man auf unserem Graphen sehr leicht eine solche Menge aufstellen kann, indem man jede einzelne dieser Sequenzen mit ihren Kanten als Pfad dieser Menge auffasst.

### 3.5.3 Satz

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 [Abd97].

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. Wie man sich denken kann, entsprechen  $S(x)$  und  $P(x)$  genau unseren *Transitivitätsgrenzen* aus dem Kontext von Alignments und wir verwenden diese Begriffe synonym. Das werden wir später auch noch beweisen. Gibt es Vorgänger oder Nachfolger nicht, setzen wir diese Werte auf 0 beziehungsweise die Länge des Pfads, um den es geht, addiert mit eins.

Für Elemente  $x$  und  $y$  auf zwei Pfaden  $P_i$  und  $P_j$  kann man sich leicht überlegen, dass aus  $pos(x) \leq P(y)[i]$  folgt, dass  $(x, y) \in E^*$  gilt. Die gleiche Aussage folgt aus  $pos(y) \geq S(x)[j]$ . Wie man sieht ist es also möglich die transitive Hülle auf  $O(k \cdot \nu)$  Speicherplatz zu sichern, wenn man ein SSDP mit  $k$  Pfaden hat. Das kann signifikant weniger sein, als die  $O(\nu^2)$  Kanten, die man im naiven Ansatz speichern muss.

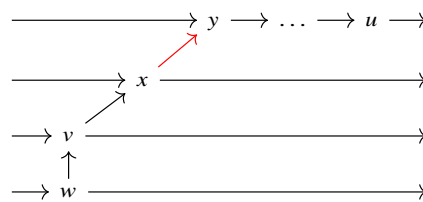


Abbildung 3.2: Füge  $(x, y)$  ein.

Beispiel  $S(x)$  und  $P(x)$

Als nächstes führen wir eine Funktion 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 jedes Mal inkrementell die Funktion auf. Das ist beispielsweise der Fall, wenn wir ein längeres Fragment zu unserem Alignment hinzufügen. Im Folgenden seien die transitive Hülle und die *Transitivitätsgrenzen* unseres ursprünglichen Graphen gegeben. Sei außerdem  $(x, y)$  die Kante, die wir ergänzen.

Nun wählen wir einen beliebigen, aber festen 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 *Vorgängergrenze* immer nur wachsen kann, während die *Nachfolgergrenze* höchstens sinkt. Des Weiteren kann sich durch eine Kante von  $x$  nach  $y$  nur die *Vorgängergrenze* von  $u$  in einer Sequenz verändern, wenn  $u$  ein Nachfolger von  $y$  war und die *Nachfolgergrenze*, wenn es ein Vorgänger von  $x$  war. Im ersten Fall, wählt man dann das Maximum der beiden möglichen Werte aus und in letzterem das Minimum.

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 einen Algorithmus *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, wissen wir, dass der aktuelle Schleifendurchlauf abgebrochen werden kann, wenn die *Nachfolgergrenze* kleiner oder genauso groß ist, wie die von  $y$ . In diesem Fall würde sie eh nicht mehr aktualisiert werden und wir können uns die Berechnung sparen. Für die *Vorgängergrenzen* gehen wir analog vor. Jetzt haben wir alles Rüstzeug zusammen, um Satz 3.5.3 zu beweisen.

*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 dadurch, dass es sein kann, dass nur für die ursprünglichen Kanten  $\mu_0$  im Graphen und die sie verbindenden Knoten die *if-Bedingungen 6 und 14* nicht erfüllt sind.

Ist das wirklich der Grund?  
Denk nochmal drüber nach.

Wenn wir darüber nachdenken 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 aber 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. 3.2). Gleichzeitig muss gelten, dass  $u$  ein Nachfolger von  $y$  ist. Das liegt daran, dass 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  $(x, y)$  addiert wird. Nach dieser Aktualisierung kann die Kante  $(w, v)$  die *Transitivitätsgrenzen*

**Algorithmus 4** EdgeAddition**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 if
21:        end if
22:      end procedure

```

von  $u$  nie wieder anpassen. Das bedeutet, dass dies für einen Knoten  $u$  höchstens so oft passieren, wie es Kanten gibt, die in keinem Pfad des SSDP liegen. Das sind genau  $O(\mu - \mu_p)$  und es folgt, dass es insgesamt höchstens  $v \cdot (\mu - \mu_p)$  solcher Aktualisierungen geben kann.

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.

**3.5.4 Definition** (Alignmentgraph)

Zunächst übertragen wir daher unsere Sequenzen  $S = \{S_1, \dots, S_n\}$  auf einen Graphen mit SSDP. Hierbei ist jede Stelle aus  $S$  ein Knoten und 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.

Gibt es zwischen  $u$  und  $v$  Pfade in beiden Richtungen ( $(u, v)$  und  $(v, u) \in E^*$ ), dann symbolisieren 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 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.

Wir nennen einen Alignmentgraphen mit seinem SSDP  $(G, P)$  auf einer Menge von Sequenzen  $S$  genau dann *regulär*, wenn die Relation auf der er beruht ein Alignment ist. Das heißt, wenn die Zuweisungen keine Inkonsistenzen enthalten.

### 3.5.5 Lemma

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 haben 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, wie wir wissen, die Zuweisungen in Zuweisungsspalten untereinander schreiben. Da dies möglich ist, sind alle Anker Zuweisungsspalten und keiner enthält zwei oder mehr Knoten aus der selben 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 man eine Zuweisung zwischen zwei Stellen  $s$  und  $t$  und die korrespondierenden Kanten in  $G$  hinzugefügt hat. Falls ja, dann nennen wir  $s$  und  $t$  alignierbar, einen Begriff, den wir zuvor bereits informell genutzt haben.

### 3.5.6 Lemma

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 andersrum gegeben hätte und die Vorbedingung verletzt gewesen wäre. Das liegt daran, dass es zwischen diesen Knoten vom selben Pfad ja 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 koinzidiert. 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  $P$  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  $P$  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 miteinander alignierbar nach dem letzten Lemma. 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 von  $u$  auf dem Graphen  $P_i$   $P(u)[i]$  ist wie wir gezeigt haben auch gleichzeitig auch der am weitesten rechts stehende Knoten  $v$ , für den in unserem Alignment  $v \leq_{\mathcal{A}} u$  gilt. Es folgt  $P(u)[i] = \text{Pred}_{\mathcal{A}}(u, i)$  und für die Nachfolgergrenzen gilt das selbe.

### 3.5.7 Korollar

Für eine Menge an Sequenzen  $S = \{S_1, \dots, S_n\}$  und zugehörigem 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, wenn  $L$  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 die Anzahl an möglichen Paaren zwischen den Sequenzen mal zwei, 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 42 abgefangen.

Die maximale Anzahl an möglichen Kanten wird erreicht, wenn man  $O(L)$  Anker hat, die sich über möglichst viele Sequenzen spannen. Es ist zwar möglich, dass man deutlich mehr Anker hat (bis zu  $O(n \cdot L)$ ), aber das ginge mit einer Reduzierung der zu überprüfenden Kanten einher. Im schlimmsten Fall kommt es also zu  $O(n \cdot L)$  rechenintensiven 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  $O(n \cdot L)$  Kanten für unsere Pfade für jede Sequenz, sowie im Worst-Case für  $O(L)$  Anker die jeweils bis zu  $n^2$  Verbindungen zwischen den Symbolen dieser Zuweisungsspalte. Der benötigte Speicherplatz beträgt somit  $O(n^2 \cdot L)$ .  $\square$

Die Schlussfolgerung des letzten Satzes ist, dass es möglich ist die *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 zu berechnen.

Durch ein paar geschickte Tricks ist es [AM00] gelungen die Laufzeit und den Speicherplatz für die DIALIGN-Implementierung mit GABIOS-LIB weiter zu verbessern. Wenn zwei Stellen aus  $S$  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  $y = (i, p')$  überein mit  $p < p'$ , 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 kann man 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 sind, 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. Man kann jetzt einen AVL- oder B-Baum pro Sequenz nehmen über der Ordnung der Startpunkte aller Intervalle. 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

Sobald Beispiele für Transitivitätsgrenzen gegeben sind, hier darauf verweisen



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 nicht Teil dieser Bachelorarbeit sein.

### 3.5.3 Einbindung in DIALIGN

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

DIALIGN ist ein segmentbasiertes Verfahren für multiples Sequenzalignment. Unser Algorithmus `EdgeAddition` addiert aber immer nur eine einzelne Kante, die eine symbolweise Zuweisung darstellt, zu unserem Alignmentgraphen. Um sicherzustellen, dass ein ganzes Fragment, das wir zu unserem Alignment hinzufügen wollen, 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 finden kann, um diese zum Alignment hinzuzufügen als `EdgeAddition`. In diesem Fall wäre der Algorithmus nur für die beiden Randpaare unseres Fragments nötig.

### 3.5.4 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 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 (Ausnahme: 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.

### 3.5.5 Beispiel Konsistenzgrenzen

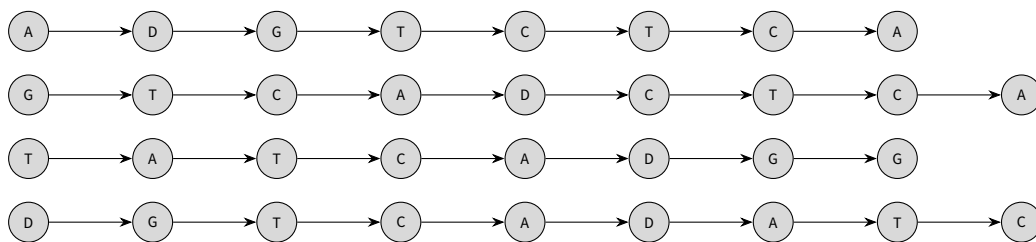
Für die Konsistenzgrenzen brauchen wir in jedem Schritt unseren Alignmentgraphen, alle Äquivalenzklassen unseres Alignments, deren *Vorgänger*- und *Nachfolger*grenzen und die Felder `nextClass` und `prevClass` für alle Waisen. Der Übersichtlichkeit halber gebe ich nicht die ganzen Felder an, sondern nur die Werte ungleich „NIL“. Zur Erinnerung hier nochmal der aktuelle Zwischenstand mit unseren Fragmenten sortiert nach *Überlappungsgewichten*.

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.

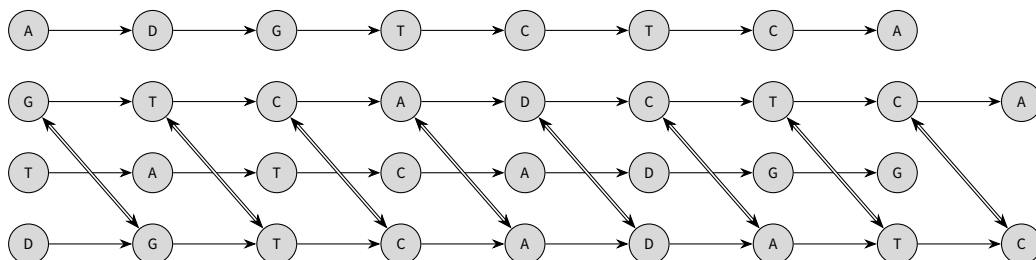
#### Ursprungszustand

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 auch 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 *Nachfolger*grenzen 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	$[(2, 1)]_{\mathcal{A}}$	$[(2, 2)]_{\mathcal{A}}$	$[(2, 3)]_{\mathcal{A}}$	$[(2, 4)]_{\mathcal{A}}$
Äqu.klasse	$\{(2, 1), (4, 2)\}$	$\{(2, 2), (4, 3)\}$	$\{(2, 3), (4, 4)\}$	$\{(2, 4), (4, 5)\}$
	$[(2, 5)]_{\mathcal{A}}$	$[(2, 6)]_{\mathcal{A}}$	$[(2, 7)]_{\mathcal{A}}$	$[(2, 8)]_{\mathcal{A}}$
	$\{(2, 5), (4, 6)\}$	$\{(2, 6), (4, 7)\}$	$\{(2, 7), (4, 8)\}$	$\{(2, 8), (4, 9)\}$

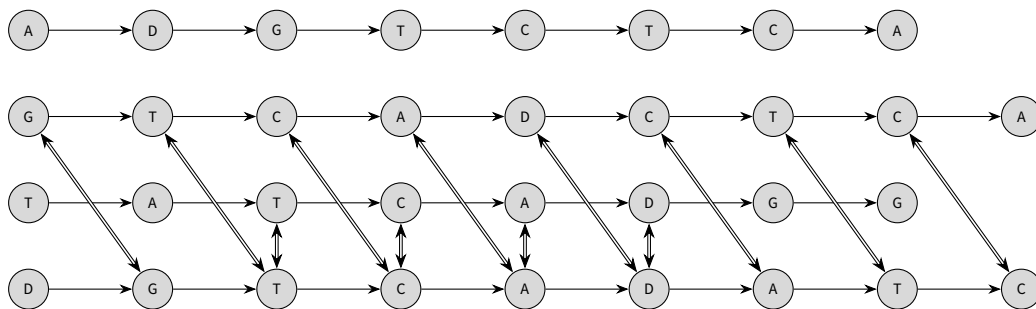
Bei den Waisen werden nur die Stellen beeinflusst, die in den Sequenzen liegen, die bereits ein Fragment enthalten, aber nicht selbst Teil davon sind.

$j$ $(i, p)$	$Pred((i, p), j)$				$Succ((i, p), j)$				prevClass		nextClass	
	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  $(\text{TCAD})_{\text{TCAD}}$  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	$[(2, 1)]_{\mathcal{A}}$	$[(2, 2)]_{\mathcal{A}}$	$[(2, 3)]_{\mathcal{A}}$	$[(2, 4)]_{\mathcal{A}}$
Äqu.klasse	$\{(2, 1), (4, 2)\}$	$\{(2, 2), (3, 3), (4, 3)\}$	$\{(2, 3), (3, 4), (4, 4)\}$	$\{(2, 4), (3, 5), (4, 5)\}$
	$[(2, 5)]_{\mathcal{A}}$	$[(2, 6)]_{\mathcal{A}}$	$[(2, 7)]_{\mathcal{A}}$	$[(2, 8)]_{\mathcal{A}}$
	$\{(2, 5), (3, 6), (4, 6)\}$	$\{(2, 6), (4, 7)\}$	$\{(2, 7), (4, 8)\}$	$\{(2, 8), (4, 9)\}$

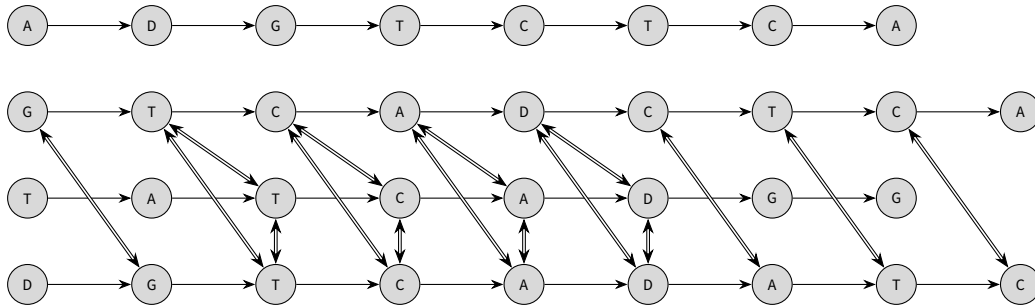
Zu aktualisieren sind die *Transitivitätsgrenzen* für die dritte Sequenz und die Prev- und NextClass-Einträge der Stellen von  $S_3$ , die vor oder hinter unserem Fragment liegen. Da diese jeweils am Start oder Ende positioniert sind, ist nur einer der beiden Einträge relevant.

### 3 DIALIGN

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

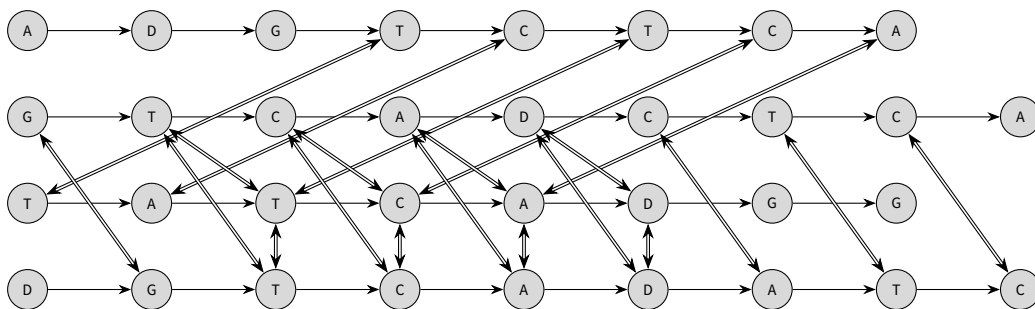
#### Drittes Fragment

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

$j \backslash (i, p)$	$Pred((i, p), j)$				$Succ((i, p), j)$				prevClass		nextClass	
	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	6	1	3	2	(2, 9)	8	(4, 1)	1
$[(2, 2)]_{\mathcal{A}}$	6	2	3	3	6	2	3	3	(3, 7)	6	(3, 1)	3
$[(2, 3)]_{\mathcal{A}}$	7	3	4	4	7	3	4	4	(3, 8)	6	(3, 2)	3
$[(2, 4)]_{\mathcal{A}}$	8	4	5	5	8	4	5	5			(1, 1)	4
$[(2, 5)]_{\mathcal{A}}$	0	5	6	6	9	5	6	6			(1, 2)	4
$[(2, 6)]_{\mathcal{A}}$	0	6	6	7	9	6	9	7			(1, 3)	4
$[(2, 7)]_{\mathcal{A}}$	0	7	6	8	9	7	9	8				
$[(2, 8)]_{\mathcal{A}}$	0	8	6	9	9	8	9	9				
$[(1, 4)]_{\mathcal{A}}$	4	0	1	0	4	2	1	3				
$[(1, 5)]_{\mathcal{A}}$	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 noch möglich, denn  $NextClass((1, 3)) = 4$  und  $Succ((1, 4), 2) - 1 = 1$ . Für  $(1, 3) = (T)$  gilt das nicht mehr, denn  $Succ((1, 4), 2) - 1 = 1 < 2$ . 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 nochmal durch und wiederholen dies, bis es keine neuen Fragmente mit positivem Gewicht mehr gibt [MDW96]. In der Praxis stellt man fest, dass es in der Regel 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 noch unsere Ausgabe vorbereiten. Das Ziel ist dabei alignierte Symbole als Groß- und Waisen als Kleinbuchstaben darzustellen. Zudem sollen die Zuweisungsspalten genau übereinander stehen, wofür unter Umständen das Einfügen von Leerzeichen in die Ausgabesequenzen nötig ist. Hierfür sortieren wir alle

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

Alignmentgraphen für das Einfügen von Lücken benutzen?

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

#### 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 unserer Tabelle und dem parallelen traversieren sortierter Listen können wir in-place und in  $O(n^3 \cdot L)$  Zeit unsere *Überlappgewichte* berechnen. Mein Verbesserung dieses Schrittes ist an dieser Stelle wichtig, weil sonst der naive Ansatz mit Laufzeit  $O(n^4 \cdot L^2)$  die Gesamtkomplexität dominiert hätte.

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 3.5.3 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 zu anderen Programmen für multiple Sequenzalignments unterzogen. Diese möchte ich im Folgenden kurz zusammenfassen.

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 unter den besten dreien ab.

Es ist sinnvoll bei zu alignierenden Sequenzen zwischen lokal und global verwandten zu unterscheiden. Lokal verwandte haben nur Ähnlichkeiten in begrenzten Abschnitten, während der Rest höchstens zufällige Übereinstimmungen enthält. 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 hat man festgestellt, dass DIALIGN 1 und 2.0 auf global verwandten Sequenzen vergleichbar zu globalen Alignern wie CLUSTAL W und DCA zu sein scheinen [MAHD98]. Bei lokal verwandten Sequenzen war DIALIGN 2.0 allen anderen getesteten Programmen hingegen weit überlegen. Ein weiterer Vorteil ist, dass DIALIGN 2.0 anders als der Vorgänger und viele der anderen Programme unabhängig von benutzerdefinierten Eingaben war.

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 starten damit nach dem Berechnen paarweiser Alignments zunächst die beiden ähnlichsten Sequenzen zu verwenden und dann der Reihe nach die jeweils ähnlichste Sequenz ins multiple Alignment einzufügen, 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 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.

Mit Hilfe vom parallelen Traversieren über sortierte Listen können wir dann effektiv die Überschneidungen der Fragmente finden und diese damit neu gewichten. Nachdem wir unsere Fragmente nach ihren Gewichten sortiert haben, fügen wir sie der Reihe nach in unser multiples Alignment und unseren Alignmentgraphen ein, vorausgesetzt die Konsistenz wird durch sie nicht verletzt. Die so entstandenen Anker wählen wir dann als Grenzen für Teilsequenzen und führen zwischen diesen iterativ das selbe Verfahren solange durch, bis es keine Fragmente mit positiven Gewichten mehr gibt. Zum Schluss konstruieren wir die Ausgabe, indem wir nichtalignierte Symbole klein und alignierte groß schreiben, sowie Lücken in unsere Sequenzen einfügen, 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 dezidierte Algorithmen 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 es ein sehr flexibler Algorithmus, der für eine Vielzahl an Anwendungen angemessen 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 mit gelöschten oder eingefügten Segmenten gehen wir um, indem ein einzelnes längeres Fragment in zwei oder mehr kürzere aufgeteilt wird [MFDW97]. Es ist außerdem anzunehmen, dass der segmentbasierte Ansatz von DIALIGN insofern für die Benutzer angenehmer ist, als dass nicht auf Biegen und Brechen versucht wird die kompletten Sequenzen in ein Alignment einzufügen, selbst wenn es keine Ähnlichkeit gibt. Man stellt fest, dass es für einen Alignierer fast genauso wichtig ist, nichtverwandte Abschnitte auch 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 eigentlich 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 die Gütefunktion, also in unserem Fall der Score unseres Alignments, bildet die Wirklichkeit unzureichend ab und weist bedeutungslosen Abschnitten größere Werte zu, als anderen wichtigen Motiven. Oder aber die Gütefunktion ist grundsätzlich richtig, aber dafür werden beim zusammensetzen des multiplen Alignments die falschen Fragmente ausgewählt. In diesem Fall liegt das Problem bei unserer Heuristik, die gierig die Fragmente nach Gewicht und Konsistenz auswählt.

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



treten. Bei der Quantifizierung gibt es zunächst zwei verschiedene Möglichkeiten, wie man feststellen kann, ob und wie gut ein Alignment wirklich 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 eigentlich nicht so schlecht ist.

[MPDS06] haben DIALIGN auf einer Vielzahl von Sequenzen untersucht, um festzustellen welche Probleme beim Alignieren auftreten. Die schlechte Nachricht: beide der oben genannten treten auf, abhängig von den zu alignierenden Sequenzen. Das erste Testalignment war eine Menge von Genen des Pufferfischs *Takifugu rubripes*. Diese enthalten sogenannte Hoxgene, die die Ausbildung von Vorder- (Kopf) und Hinterteilen (Schwanz) bei der Klasse der Bilateria regulieren. Zu den Bilateria gehören alle Tiere, die einen bilateralsymmetrisch aufgebauten Körper haben, also beispielsweise alle Säugetiere, Würmer, Fische, Fische oder Amphibien. Die Hoxgene sind evolutionär gesehen sehr alt und ihre Geschichte wurde durch viele Tandemduplikate dominiert. 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 Hoxgene 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 eben nicht die richtigen Paare von Hoxgenen in unserem Alignment waren. Genau diese Erfahrung hat man auch bei *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 Hoxgene schwer eine entsprechende Gütefunktion zu finden. Mögliche Ansätze können Machine Learning oder semiautomatisierte Verfahren sein, wo ein Mensch mit Expertenwissen bestimmte Abschnitte von Hand zuweist (Verankerung<sup>1</sup>) und lediglich die Abschnitte dazwischen maschinell aligniert [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 gierig die Fragmente mit den höchsten Gewichten wählt. Wenn man Pech hat läuft man so in ein lokales Maximum, indem man Fragmente wählt, die hohe Gewichte, aber geringen biologischen Wert haben und über Inkonsistenzen verhindern, dass andere bedeutungsvollere Zuweisungen gewählt werden.

<sup>1</sup>Im englischen Original auch „anchor“. Um Verwirrung mit unseren Ankern vorzubeugen hier umbenannt.

### 3 DIALIGN

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 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 [CPM10] basiert auf Flussnetzen und weiteren graphtheoretischen Ansätzen, die eine flexiblere Auswahl der Anker unseres multiplen Alignments ermöglichen.

## 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 von [CPM10] betrachten.

Dazu benötigen wir zwei verschiedene Graphen: zum einen den *Inzidenzgraphen*, bei dem alle Stellen Knoten sind und ihre Anker Zusammenhangskomponenten. Der zweite ist der *Sukzessionsgraph*, der die Zusammenhangskomponenten unseres Inzidenzgraphen als Knoten und die natürliche Ordnung auf den Sequenzen als Kanten benutzt. Man kann sich vorstellen, dass genau dann eine Kante zwischen zwei Diese beiden Datenstrukturen werden wir benutzen, um Inkonsistenzen aufzulösen. Wenn wir uns an die Definition von 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 unserem Fall nicht. Dann konstruieren wir 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 mit diesem 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

Stell dir eine Produktionsstätte vor, wo ein bestimmtes Produkt hergestellt wird und eine Verwendungsstätte bei der das Produkt benötigt wird. Zwischen dem Ort der Produktion und dem Ort der Verwendung gibt es ein Schienennetz über das die Produkte geliefert werden können. Über jeden Abschnitt der Schienen kann aber nur eine bestimmte Anzahl an Waggonen geleitet werden. So mag es weniger stark befestigte Strecken geben, wo nur kleinere oder leichtere Züge fahren können und andere gut ausgebaute mit mehreren Gleisen nebeneinander. Die Anzahl an Einheiten, die über einen Abschnitt geleitet werden können, nennt man Kapazität, während Produktionsstätte und Zielort Quelle und Senke heißen. Ziel ist es zu bestimmen wie viele Produktionseinheiten über dieses Netz von der Fabrik zum Verbraucher geliefert werden können.

Neben diesem Problem kann man mit Flussnetzwerken noch viele andere Anwendungen modellieren, zum Beispiel eine chemische Produktionsstraße mit vielen Rohren, die

#### 4 Ein Min-Cut-Ansatz für das Konsistenzproblem

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. Für eine Hochspannungsleitung mag dieser sehr hoch und für die Leitungen, die direkt zu den Häusern gehen, sehr klein sein. Stromnetze bieten uns auch eine direkte Analogie, wie mit den Knotenpunkten zwischen den Verbindungen umzugehen ist. An jedem Knoten, außer der Quelle und Senke, wird genauso viel Fluss hinein- wie wieder hinausgeleitet. Es wird nichts gespeichert oder geht verloren. Dieses Konzept, das man Flussserhaltung nennt, funktioniert genau wie das erste Kirchhoffsche Gesetz bei Strömen [CLRS09, S.708].

Ursprünglich stammt das Konzept des Flussnetzwerkes aus dem Kalten Krieg und der militärischen Forschung. Es wurde das Schienennetzwerk des Sowjetunion in Osteuropa untersucht, um herauszufinden wie viel Material die UdSSR im Kriegsfall aus dem russischen Kerngebiet nach Mitteleuropa transportieren könnte und welche Strecken man zerstören müsste, um den Nachschub am schnellsten abzuschneiden. Die Untersuchung bietet uns sogleich einen intuitiven Begriff des *maximalen Flusses* und des *minimalen Schnitts*. Der *maximale Fluss* ist die maximale Anzahl an Einheiten, die von der Quelle zur Senke transportiert werden kann, während der *minimale Schnitt* den „Bottleneck“ des Netzwerkes darstellt, der den Fluss von der Quelle zur Senke minimiert. Wie wir später formal zeigen werden sind diese beiden Werte in einem Flussnetzwerk äquivalent.

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 danach beweisen wir die Äquivalenz von diesen mit minimalen Schnitten. Diese minimalen Schnitte brauchen wir später zum Auflösen von Inkonsistenzen im Inzidenzgraphen.

##### 4.1.1 Definition (Flussnetzwerk)

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 bei dem es zwei ausgezeichnete Knoten  $s, t \in V$  gibt, 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)

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

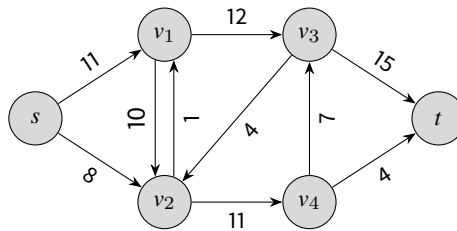
**Kapazitätsbeschränkung:** Für alle Knoten  $u, v \in V$  gelte  $0 \leq f(u, v) \leq c(u, v)$ .

**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 verletzt wird und in jeden Knoten soviel hinein wie hinaus fließt. Wir nennen auch den Wert  $f(u, v)$  Fluss zwischen den beiden Knoten  $u$  und  $v$ .

Hier ein Beispiel für ein einfaches Flussnetzwerk mit sechs Knoten:



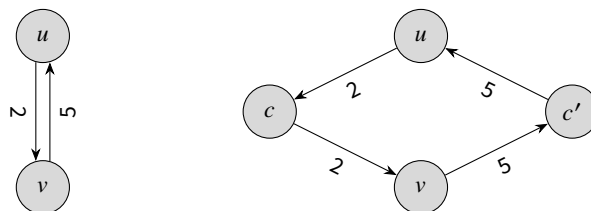
Viele Autoren setzen voraus, dass es keine Kanten in die Senke und keine aus der Quelle gibt. Diese Beschränkung ist zwar hilfreich fürs Verständnis, wird aber grundsätzlich nicht benötigt. Man kann sich leicht überlegen, dass selbst wenn es solche Kanten gibt, ihr Fluss 0 sein muss. Bei den Flussnetzwerken, die wir für unseren Algorithmus benutzen, wird es diese Kanten geben, weshalb wir auf die Beschränkung verzichten.

#### 4.1.3 Definition (Wert eines Flusses)

Der Wert eines Flusses ist definiert als

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

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  $x \geq 0, y \geq 0$ . 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.



#### 4.1.2 Wichtige Algorithmen

Es gibt eine Vielzahl von Algorithmen zur Berechnung eines maximalen Flusses auf einem Flussnetzwerk. Die wichtigsten und bekanntesten Vertreter möchte ich kurz vorstellen.

Der erste Algorithmus, der speziell zum Berechnen des maximalen Flusses entwickelt wurde war der Algorithmus von Ford-Fulkerson [GT14]. 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. 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 Dinic<sup>1</sup> 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 sogenannten *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 *Relabel*methoden 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, läuft in  $O(|V|^2 \cdot |E|)$ . Mit einer FIFO-Warteschlange in dem 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 Datenstruk-

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

tur 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*

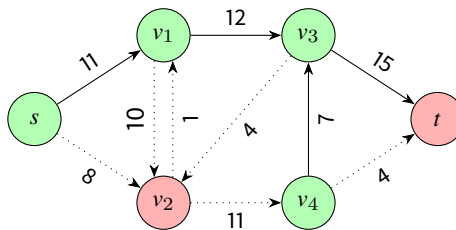
#### 4.1.4 Definition (Schnitt)

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 Kante  $(v_3, v_2)$  also schon, die 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)

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

Dem geneigten Leser mag die Asymmetrie zwischen *Flüssen*, die maximal sein können und Schnitten, die minimal sein können, aufgefallen sein. Den Zusammenhang der beiden Konzepte möchte ich im Folgenden kurz beschreiben. 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

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)

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

*Beweis.* Wenn wir an den Algorithmus von Ford-Fulkerson denken, dann erinnern wir uns, dass dieser solange augmentierende Pfade mit positiver *Restwertkapazität* von der Quelle zur Senke gesucht hat, bis es keinen solchen mehr gab. Sobald das der Fall war, 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.]. □

Die Erkenntnis, die man aus diesem Satz zieht, ist, dass man Algorithmen zur Berechnung des maximalen Flusses benutzen kann, um den minimalen Schnitt eines Flussnetzwerkes zu bestimmen. Das werden wir im nächsten Abschnitt ausnutzen, um Inkonsistenzen zwischen unseren Sequenzen aufzulösen.

## 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)

Es sei eine Menge an Sequenzen  $S$  mit Stellenraum  $S$  gegeben. Eine Teilmenge  $C \subset S$  nennen wir mehrdeutig, wenn es mindestens eine Sequenz  $S_i$  gibt, sodass  $C \cap S_i$  zwei oder mehr Stellen  $(i, p), (i, p') \in S$  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  $C \subset S$  bezeichnen wir als *partielle Zuweisungs-*



spalte.

Es lässt sich folgern, dass eine konsistente Äquivalenzrelation auch nicht mehrdeutig ist, während das Gegenteil im Allgemeinen nicht gilt. 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.

#### 4.2.2 Definition (Inzidenzgraph)

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 sie 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 Beispiele aber stehen.

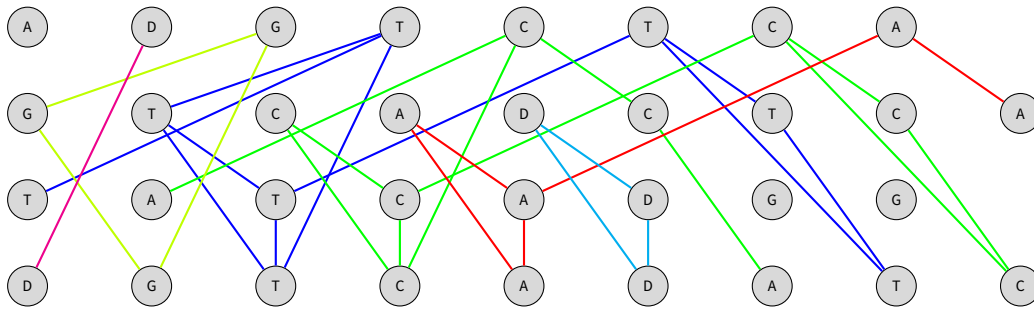
#### 4.2.2 Beispiel Inzidenzgraph

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 einen Inzidenzgraphen bei denen 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 Ein Min-Cut-Ansatz für das Konsistenzproblem



##### 4.2.3 Mehrdeutigkeiten Auflösen

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. 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 leider. Weil ich den Ansatz mit den nicht-unitären Kapazitäten als sehr sinnvoll erachte, habe ich ihn bei unseren Beispielen verwendet.

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 dichtbesetzten 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 verwenden beziehungsweise ihn verwendet hätten, wenn die Zeit dafür gereicht hätte. 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.

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  $\text{Grad} < k$  zunächst

Graphik aus CPM10 mit Zusammenhangskomponenten einfügen.

**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

```

nicht betrachtet werden, sodass andere kleinere Zusammenhangskomponenten vorliegen. Als erstes werden für den reduzierten Kantensatz  $E_k = \{(u, v) \in E \mid \min\{\deg(u), \deg(v)\} \geq k\}$  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 null gesetzt wurde, hat man alle Knoten betrachtet und es liegen nur noch partielle Zuweisungsspalten vor.

Abgesehen von der verbesserten Laufzeit scheint dieses Vorgehen aber keine Vorteile zu bieten und falls doch, werden diese in [CPM10] nicht genannt. Deshalb verzichte ich auf die Grenze  $k$  und gehe davon aus, dass aufgrund des deutlich effizienteren Algorithmus für den maximalen Flusses und die Verwendung einer schnellen Graphimplementierung aus einer Bibliothek keine Laufzeitprobleme für die üblichen Anwendungsgrößen auftreten.

Bis jetzt wurde nur gesagt, dass wir mehrdeutige Zusammenhangskomponenten auswählen und für diese jeweils einen Knoten aus der selben Sequenz als Quelle und Senke wählen. Abschließend müssen wir also noch festlegen in welcher Reihenfolge diese gewählt werden. Für die Zusammenhangskomponenten müssen wir keine Reihenfolge festlegen, 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, sondern es kann mehrere solche 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

keine eigene Implementierung, also Text über  $k$  anpassen.

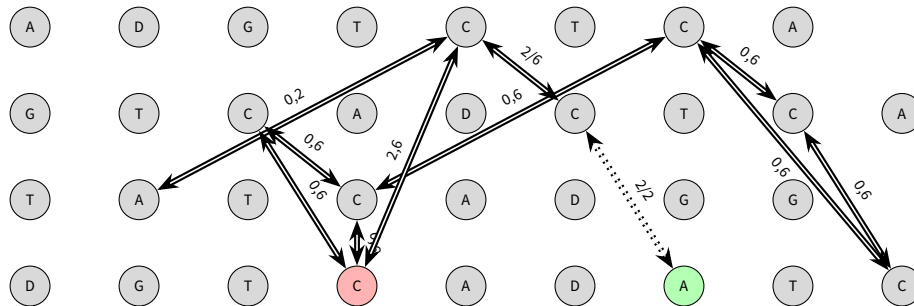
Dieser Abschnitt muss noch ein bisschen umformuliert werden, weil das Verfahren nicht implementiert wurde. Also lieber den ursprünglichen Algorithmus mit Grenze  $k$  zeigen.

#### 4 Ein Min-Cut-Ansatz für das Konsistenzproblem

sich durch die nur durch Kanten mit *Restwertkapazität* 0 verbundenen Subgraphen im Restwertgraphen ergibt.

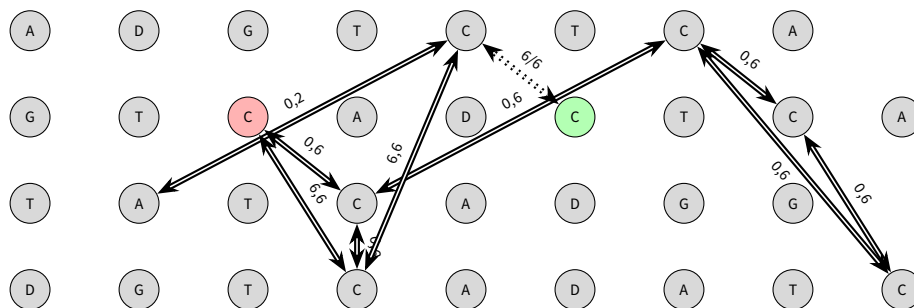
##### 4.2.4 Beispiel von ResolveAmbiguities

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.

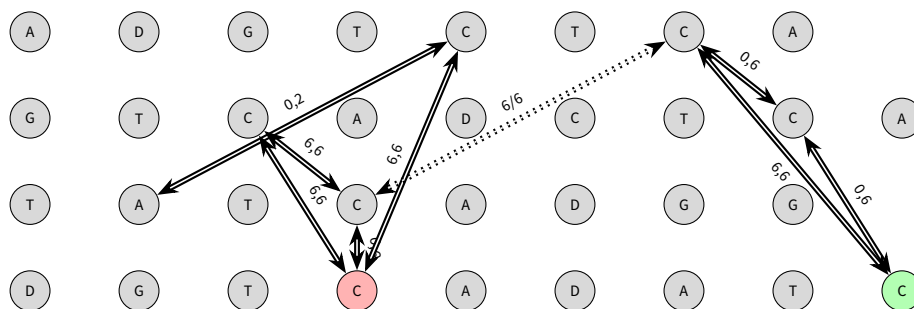


Sowohl  $S_2$ , als auch  $S_4$  haben drei Knoten in  $C$ . Wir wählen hier  $S_4[7]$  als Quelle und  $S_4[4]$  als Senke, weil diese den kleinsten bzw. größten Knotengrad haben. In diesem Fall passiert nichts spannendes, weil der minimale Schnitt aufgrund der Kante mit Kapazität 2 direkt die Quelle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

Im nächsten Schritt hat  $S_2$  mit 3 die meisten Knoten in  $C$ . Da alle zwei der Knoten Grad 2 haben, entscheiden wir uns für  $S_2[6]$  als Quelle und  $S_2[8]$  als Senke. Auch hier wird direkt die erste Kante an der Quelle gelöscht.



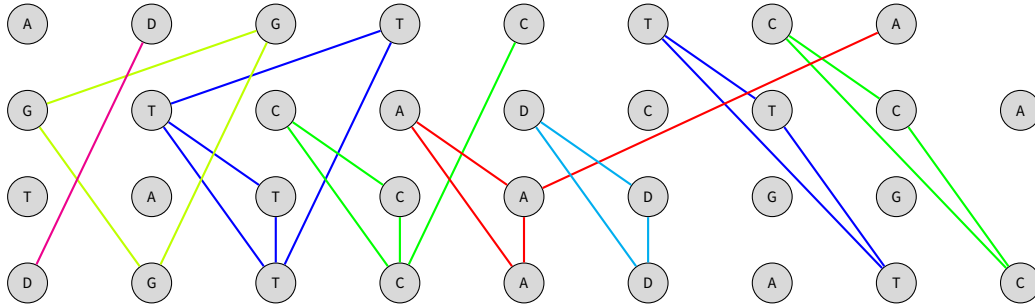
Gehen nun wieder zu Sequenz  $S_4$  und wählen  $S_4[9]$  als Quelle und  $S_4[4]$  als Senke. Hier haben wir zwei relativ dichte Subgraphen, die nur durch die eine Kante ( $S_1[7] \rightarrow S_3[4]$ ) miteinander verbunden sind. Diese löschen wir und danach gibt es in der rechten Zusammenhangskomponente keine Mehrdeutigkeiten mehr.



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

Abschließend wird noch 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  $O(n^2)$  davon 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 muss, 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  $O(n^3 \cdot L^{5/2})$ . Wenn wir Pech haben, 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 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, fürs zweite eine Breitensuche und letzteres ist simples Iterieren über alle Kanten.

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 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 monströsen Inzidenzgraphen, der nur aus einer einzigen Zusammenhangskomponente besteht. Nach einer Laufzeit von 20 Stunden ohne Ergebnis wurde der Lauf auf 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

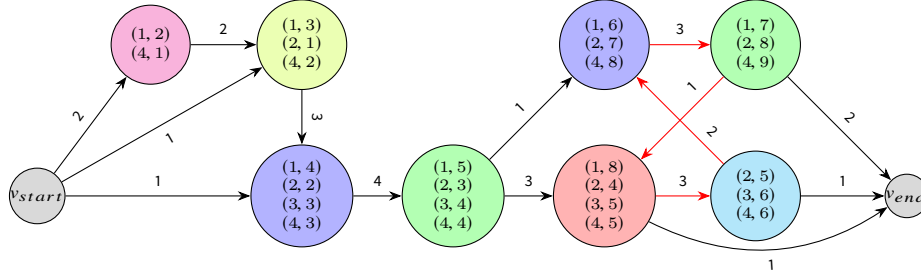
Wie wir gesehen haben, ist die Menge an Zuweisungen nach dem `ResolveAmbiguities`-Aufruf noch nicht konsistent, aber es liegen keine Mehrdeutigkeiten mehr vor. Das zwingt uns dazu weitere Verbindungen aus der Äquivalenzrelation zu löschen, bis diese ein Alignment, also konsistent ist. Wir führen dazu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

##### 4.3.1 Definition (Sukzessionsgraph)

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. Dann definieren wir den Sukzessionsgraph  $SG(C) = (C, E)$  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.

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. Die Knotenfarben wurden in der Farbe der Zusammenhangskomponenten des Inzidenzgraphen aus dem letzten Schritt gewählt.



#### 4.3.2 Lemma

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.  $pos(s_1) < pos(s'_1)$  und  $pos(s'_2) < pos(s_2)$

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  $pos(s_1) < pos(s'_1)$ , weshalb  $s_1 \not\leq s'_1$  folgt. Das steht im Widerspruch dazu, dass  $C$  konsistent war.

„ $\Leftarrow$ “: Wir benutzen einen Kontrapositionsbeweis und es 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  $S_1$  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 kreisfreien 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, indem wir Kanten entfernen. Optimal wäre es Kanten mit einer minimalen Summe von Kantengewichten zu entfernen. Leider ist dieses Problem, das auch als „minimal weighted feedback arc set“-Problem bekannt ist, NP-schwer. Als Folge bedienen wir uns einfach 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

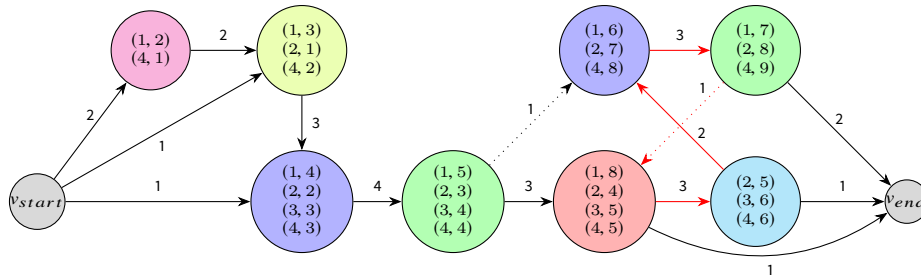
$$E_k := \{(u, v) \in E \mid w(u, v) > k \text{ oder } u = v_{start} \text{ oder } v = v_{end}\} \text{ mit} \quad (4.3)$$

$$k^* := \min\{k > 0 \mid (V, E_k) \text{ ist azyklisch}\}$$

Für den Fall, dass durch das Löschen von Kanten der Graph 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 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 gestrichelt dargestellt. Das sieht dann so aus:



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

Sei eine Sequenz  $S_i \in S$  gegeben. Dann ist  $C_{S_i}$  die Teilmenge von Zusammenhangskomponenten aus  $C$ , die Stellen aus  $S_i$  enthalten. Wir definieren außerdem eine Beschränkung der Knoten aus  $G^*$  von  $C_{S_i}$  als  $V_{S_i} = C_{S_i} \cup \{v_{start}, v_{end}\}$ . 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

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  $u \leq_{S_i}^* v \implies u \leq_{S_i} v$ . Das war aber genau die Definition für Konsistenz: dass die Relation die natürliche Ordnung auf den Sequenzen erhält. Wie entfernen daher alle Stellen unserer Sequenz aus den Knoten, die nicht auf dem gewählten Pfad liegen, weil diese die Konsistenz verletzen würden.

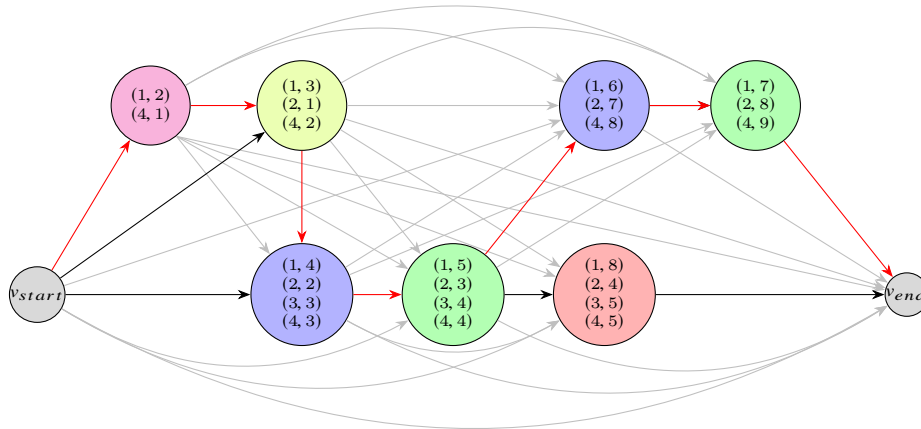
Wenn wir jetzt für jede unserer Sequenzen  $S_j$  einen Pfad von  $v_{start}$  nach  $v_{end}$  in  $G_{S_j}$  wählen und alle nicht-besuchten Stellen aus ihren Knoten entfernen, dann hält die Konsistenzbedingung auf der Relation, die durch die übriggebliebenen Zusammenhangskomponenten induziert wird. Das Resultat ist also ein Alignment. Da wir aber nicht irgendein Alignment erhalten wollen, sondern ein möglichst großes, wählen wir für jede Sequenz  $S_i \in S$  den Pfad maximaler Länge durch  $G_{S_i}$ . Auf diese Weise löschen wir die minimale Anzahl an Stellen aus ihren Zusammenhangskomponenten. Formal: Sei für eine Sequenz  $S_i$   $g_{S_i}$  ein Pfad 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  $SG(C)$  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 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.

#### 4 Ein Min-Cut-Ansatz für das Konsistenzproblem



Im Graphen  $G_{S_1}$  gibt es eine Kante vom (1, 5)er-Knoten zum (1, 6)er, 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 von  $(1, 8) \rightarrow (1, 6)$  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 des längsten Pfads

Es sei ein gerichteter, azyklischer Graph  $G = (V, E)$  gegeben. Ein einfacher Ansatz 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 Ursprungsgraph. Der Algorithmus von Bellman-Ford berechnet den kürzesten Pfad eines Ausgangsknotens (hier  $v_{start}$ ) zu allen anderen Knoten im Graphen in  $O(|V| \cdot |E|) = O(n^3 \cdot L^3)$  in unserem Fall [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)

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. Das Standardmotivati-on dafür ist das Anziehen von Kleidungsstücken: Ich muss meine Socken anziehen, bevor

ich in meine Schuhe schlüpfen kann und es kommt zuerst die Unterwäsche und dann die Hose. Erst muss ich Unterhemd und oder T-Shirt anziehen, bevor der Pullover kommt. Diese Reihenfolgen lassen sich als DAG modellieren, wobei jede Kante zwischen Kleidungsstück  $a$  und  $b$  bedeutet, dass  $a$  vor  $b$  angezogen werden muss. Gültige topologische Sortierungen für dieses vereinfachte Beispiel <sup>2</sup> sind also beispielsweise diese: „(Socken, Schuhe, Unterhose, Hose, Unterhemd, T-Shirt, Pullover)“, „(Socken, Unterhose, Schuhe, Unterhemd, T-Shirt, Pullover, Hose)“ oder „(Unterhose, Hose, Socken, Unterhemd, T-Shirt, Pullover, Schuhe)“.

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:

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

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 nur die Anzahl der Knoten von  $v_{start}$  bis  $v_{end}$ . Die Korrektheit des Algorithmus folgt aufgrund der Korrektheit der Rekursionsgleichung und weil  $distance(u)$  wegen der topologischen Sortierung bereits berechnet wurde für Knoten  $v$ , 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 einmal über die Liste iterieren und den Knoten mit der maximalen gespeicherten Länge als Endknoten des Pfades und Startknoten des Backtrackings wählen.

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

## Laufzeit

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

<sup>2</sup>Mr. Bean hat mit seiner Badehose bewiesen, dass die übliche Reihenfolge des An- und Ausziehens nicht unbedingt eingehalten werden muss.

---

**Algorithmus 6** Algorithmus zum berechnen des längsten Pfads in einem Graphen  $G_{S_i}$

---

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

```

1: procedure LONGESTPATH( $G$ )
2:    $list_{ts} \leftarrow topologicalSort(G)$ 
3:    $v_{start}.distance \leftarrow 0$ 
4:    $v_{start}.pred \leftarrow NIL$ 
5:    $current \leftarrow list_{ts}.head$ 
6:   while  $current.next \neq NIL$  do                                ▶ Berechne Distanz zu  $v_{end}$ 
7:      $current \leftarrow current.next$ 
8:      $maxPred \leftarrow \operatorname{argmax}\{u.distance \mid (u, current.key) \in E\}$ 
9:      $current.key.distance \leftarrow maxPred.distance + 1$ 
10:     $current.key.pred \leftarrow maxPred$ 
11:  end while
12:   $longestPath \leftarrow empty$                                 ▶ initialisiere Ausgabeliste
13:   $longestPath.addFirst(v_{end})$ 
14:   $currentNode \leftarrow v_{end}$ 
15:  while  $currentNode.pred \neq NIL$  do                                ▶ Backtracking
16:     $currentNode \leftarrow currentNode.pred$ 
17:     $longestPath.addFirst(currentNode)$ 
18:  end while return  $longestPath$ 
19: end procedure

```

---

Kosten aller Maximumsoperationen 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. Für die Berechnung des längsten Pfads folgt somit eine Laufzeit von  $O(L^2)$ .

#### 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 Hoxgenen des Pufferfisches im Abschnitt 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 gierig die Fragmente mit maximaler Dringlichkeit 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

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  $O(n^2 \cdot L^2)$ . Überlegungen für einen effizienteren Algorithmus haben sich als fruchtlos erwiesen. Für diesen hätten wir zuerst 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 habe ich  $O(L)$  Ebenen in meinem Graphen mit je bis zu  $O(n)$  Knoten und  $O(n)$  Kanten in andere Ebenen. Es kommt pro Ebene also zu bis zu  $O(n)$  vielen Vereinigungen. Weil die Mengen, die miteinander vereinigt werden, aber bis zu  $O(n \cdot L)$  Elemente enthalten (potentiell erreichbare Knoten), komme ich selbst unter Verwendung von Bit-Sets und Vereinigung über das bitweise Oder auf 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 ich im Allgemeinen nicht davon ausgehen kann, dass mein Graph signifikant viel weniger starke Zusammenhangskomponenten als Knoten insgesamt enthält, liefert auch der Algorithmus von Purdom 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 Algo-

rithmus 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 dabei. 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 so aus. Der Übersichtlichkeit halber wurden hier bereits Lücken eingefügt, um die Zuweisungen zu verdeutlichen. Eigentlich 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 sehen Sie zum Vergleich das Ergebnis von DIALIGN 2.2 mit der gierigen Heuristik.

- |                |               |
|----------------|---------------|
| 1. aDGTc---TcA | aDGTCTCA----- |
| 2. --GTCADcTcA | --G--TCADCTcA |
| 3. -taTCADgg-- | ---TATCADgg-- |

4. -DGTCAaTC-

-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 jeden Fall auf die Vorteile des graphtheoretischen Ansatzes hin.

#### 4.4.2 Gesamtkomplexität

##### 4.4.1 Korollar

Mit dem *Min-Cut*-Ansatz von [CPM10] lässt sich ein multiples Sequenzalignment in  $O(n^4 \cdot L^{7/2})$  Zeit berechnen.

*Beweis.* DIALIGN berechnet die  $O(n^2)$  paarweisen Alignments in  $O(n^2 \cdot L^2)$  Rechenschritten. Die Laufzeit der Berechnung der partiellen Zuweisungsspalten mit Hilfe des minimalen Schnitt liegt in  $O(n^4 \cdot L^{7/2})$ . Der Algorithmus von Pitschi hat eine Komplexität in  $O(n^2 \cdot L^2)$ . Für den Alignmentgraphen sind 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 anderen Reihenfolge haben.

Grafik einfügen.

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 (beispielsweise allen), 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 Ver-

bindungen in unserem Alignment verloren. Wir wollen am liebsten, dass die überkreuzten Stellen nicht aligniert werden, der Rest hingegen ganz 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. Ein Beispiel sind die abstrahierten Proteinsequenzen [A,B,C,D] und [B,C,D,A]. Erstmalig 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 [ELS93] beschrieben, der in  $O(|E|)$  Zeit einen DAG berechnet und dabei höchstens  $|E|/2 - |V|/6$  Kanten entfernt. 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 ich die ursprüngliche Heuristik zunächst für praktikabler. Denkbar ist aber ein hybrider Ansatz, bei dem wir überprüfen wie viele Kanten  $E_{k^*}$  im Verhältnis zur alten Kantenzahl enthält. Ist dieses Verhältnis zu gering (beispielsweise kleiner als 3/4), benutzen wir stattdessen den Algorithmus von Eades, Lin und Smyth auf den ursprünglichen Kanten unseres Sukzessionsgraphen.

#### 4.4.4 Evaluierung

[CPM10] haben ihre Implementierung des Verfahrens einer Vielzahl an Tests unterzogen, um sie mit einer breiten Auswahl an etablierten Verfahren zu vergleichen. 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. 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 Version 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 in zufällig erstellte und nicht zueinander in Beziehung stehende Sequenzen lokal einzelne Motive 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 sah man sich dazu gezwungen zusätzlich eine Grenze  $T$  für das minimale Gewicht eines Fragments einzuführen, wodurch die Anzahl der Kanten im Inzidenzgraphen verringert wird. 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 Future Works 6.2 des letzten Kapitels 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

#### 4 Ein Min-Cut-Ansatz für das Konsistenzproblem

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.

## 5 Programmierung

-Bestimmung des längsten Pfads mit Boost und C++



## 6 Fazit

### 6.1 Zusammenfassung

Nachdem wir mit dem Algorithmus von Needleman-Wunsch einen ersten Einblick ins Thema bekommen haben, wurden im Laufe dieser Arbeit zwei algorithmische Ansätze für das *multiple sequence Alignment*-Problem vorgestellt: DIALIGN 2.2 und der *min-cut*-Ansatz von [CPM10].

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. Mit Hilfe eines kleinen Tricks welche Fragmente wir dabei speichern mussten 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 keins mehr übrig ist. 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 mit dessen Hilfe 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 [CPM10] erweitert dieses um graphentheoretische Ansätze. Der Hauptunterschied zum ursprünglichen Verfahren ist, dass man eine Menge von multiplen Zuweisungen auf eine konsistente Menge zu verringern, statt nach und nach mit paarweisen Zuweisungen ein Alignment aufzubauen. Zunächst werden dafür die Verbindungen aller paarweisen Alignments in einem Inzidenzgraphen gesammelt. In diesem 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 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 habe ich exemplarisch einen 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 Future Works

Im Folgenden möchte ich kurz auf mögliche Weiterentwicklungen des vorgestellten Verfahrens eingehen. 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 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*. 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.

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 zwar nicht dem 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 im entsprechenden Abschnitt 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. Bei dem 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, wo 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 sagen wir 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, vergleiche ich nur Fragmente 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 ich parallel über sortierte Listen traversiere.

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, so 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. Es ist aber auf jeden

## 6 *Fazit*

Fall eine vielversprechende Idee.



# 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
- [Bel57] BELLMAN, R.: *Dynamic Programming*. Princeton University Press, 1957
- [Bel84] BELLMAN, R.: *Eye of the Hurricane*. World Scientific Publishing, 1984
- [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
- [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
- [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
- [Kus04] KUSHNER, H.: *Acceptance Speech anlässlich der Verleihung des Richard E. Bellman Control Heritage Awards*. <http://a2c2.org/awards/richard-e-bellman-control-heritage-award/2004-00-00t000000/harold-j-kushner>, 2004. – Accessed: 2018-05-18
- [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
- [SKM08] SUBRAMANIAN, A. ; KAUFMAN, M. ; MORGENSTERN, B.: *DIALIGN TX download*. <http://dialign-tx.gobics.de/download>, 2008. – Accessed: 2018-03-31
- [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. – Accessed: 2018-05-07
- [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



# Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit über „*Titel*“ 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, 18. 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, 18. Mai 2018