

KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
INFORMATIKOS FAKULTETAS
PROGRAMŲ INŽINERIJOS KATEDRA

Nerijus Paulauskas

TARPLAŠTELINIŲ PLYŠINIŲ JUNGČIŲ IMITACINIO
MODELIO KŪRIMAS IR TYRIMAS

Magistro darbas

Vadovas

Prof. H. Pranevičius

Kaunas, 2009

KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
INFORMATIKOS FAKULTETAS
PROGRAMŲ INŽINERIJOS KATEDRA

Nerijus Paulauskas

TARPLAŠTELINIŲ PLYŠINIŲ JUNGČIŲ IMITACINIO
MODELIO KŪRIMAS IR TYRIMAS

Magistro darbas

Recenzentas

Prof. E. Bareiša

2009.05.22

Vadovas

Prof. H. Pranevičius

2009.05.22

Atliko

IFM-3/2 gr. stud.

Nerijus Paulauskas

2009.05.22

Kaunas, 2009

Summary

The work describes gap junction model imitation system formally known as the GJM (Gap Junction Model). In this system created simulation models simulates electrophysiological processes in gap junction channels.

The work presents gap junction models with different formal gap junction channels specifications. Created formal models have been used in the creation of gap junction model imitation system. The system was developed using C # programming language. System was developed in groups of interfaces allowing passing gap junction model parameters and voltage excitations to different types of gap junction channels

Formulated global optimization problem for the simulation results which allows approximate imitation data to experimental data obtained from the New York, Yeshiva University, Albert Einstein College of Medicine Laboratory.

There are presented the results of simulation models and their comparisons with the results of experiments with different types of channels.

TURINYS

1	Įvadas.....	1
2	Tarpląstelinių plyšinių jungčių modelio analizė	2
2.1	Tikslai ir siekiami rezultatai	2
2.2	Tarpląstelinės plyšinės jungtys	2
2.3	Modeliai.....	4
2.3.1	Protokolai.....	5
2.3.2	2 vartų modelis	8
2.3.3	4 vartų modelis	14
2.3.4	6 koneksinų modelis.....	14
2.4	Paieška	18
2.4.1	Globalus optimizavimas	19
3	GJM sistemos projektavimas	23
3.1	Vartotojo panaudos atvejai.....	23
3.2	Bendra modulių diagrama	25
4	GJM sistemos tyrimas	32
4.1	Programinės įrangos kokybė	32
4.2	Sistemos plėtojimas	34
5	Ekspperimentai ir imitacinė sistema	35
5.1	Ekspperimentų ir imitacijos palyginimas	35
5.2	Globalus optimizavimas	37
5.3	Žmogiškasis faktorius.....	40
6	Išvados.....	42
7	Literatūra	43
8	Terminų ir santrumpų žodynas	44
9	Priedas	45

1 ĮVADAS

Darbe yra pateikta tarpląstelinių plyšinių jungčių modelio sistema formaliai vadinama GJM (Gap Junction Model). Šioje sistemoje sukurti imitaciniai modeliai imituoja elektrofiziologinius procesus vykstančius tarpląstelinėje plyšinėje jungtyje.

Darbe yra pateikta PJ (plyšinės jungties) formalūs modeliai su skirtingų PJ kanalų detalizavimu. Sudaryti formalūs modeliai buvo panaudoti kuriant PJ imitacinių modelių sistemą. Sistema sukurta panaudojant C# programavimo kalbą. Sukurta sistema grupėmis interfeisų leidžiančių užduoti modeliuojamos plyšinės jungties parametrus, bei plyšinių jungčių paduodamus įtampos sužadinimus skirtingiems PJ kanalų tipams.

Suformuluotas imitacinio modelio parametrų globalaus optimizavimo uždavinys leidžiantis modeliavimo rezultatus maksimaliai priartinti prie eksperimentinių rezultatų gaunamų iš sistemos užsakovų Niujorko, Yeshiva universiteto, Alberto Einšteino medicinos koledžo laboratorijos.

Pateikiami PJ imitacinio modelio rezultatai ir jų palyginimai su eksperimentų rezultatais prie skirtingų kanalų tipų. Taip pat pateikiami paieškos rezultatai ir globalaus optimizavimo paieškos kitimas laike.

2 TARPLĄSTELINIŲ PLYŠINIŲ JUNGČIŲ MODELIO ANALIZĖ

2.1 TIKSLAI IR SIEKIAMI REZULTATAI

Kompiuterinės imitacijos tapo naudinga realių sistemų modeliavimo dalis fizikoje, chemijoje, biologijoje, ekonomikoje, socialiniuose moksluose ir kitose mokslo srityse. Šiuo metu yra sukurta daug įvairių imitacinių sistemų [4], kurios imituoja realių pasaulio objektų elgsenas.

Tarpląstelinės plyšinės jungtys yra mažai ištirtos, yra daromos įvairios prielaidos, bei kuriami teoriniai matematiniai modeliai, kurie paaiškintų ląstelių kontaktavimą plyšinėmis jungtimis.

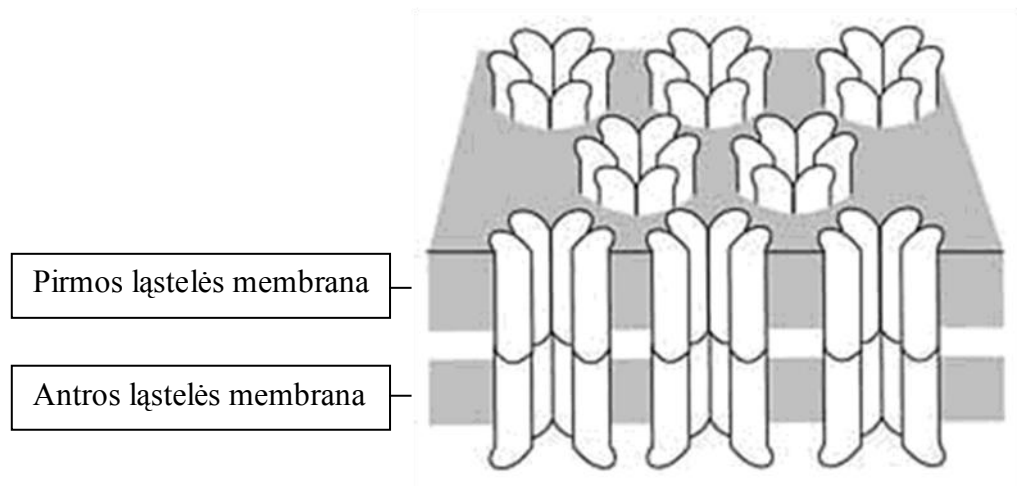
Pagrindinis GJM sistemos tikslas yra sukurti imitacinę sistemą, kuri imituotų ląstelių kontaktavimą plyšinėmis jungtimis ir padėtų pagrįsti daromas prielaidas apie jų kontaktavimą. Sukurti modeliai turėtų adekvačiai atvaizduoti ląstelių sąveikavimo procesus.

2.2 TARPLĄSTELINĖS PLYŠINĖS JUNGTYS

Koneksinai (Cx) – tai baltymai, kurie formuoja tarpląstelines plyšines jungtis kontakte tarp kaimyninių ląstelių membranų (1 pav.). Koneksinas yra pavaizduotas 2 pav. Plyšinės jungtys leidžia sujungtoms ląstelėms perduoti elektrinius ir metabolinius signalus [1,2,3].

Kiekvienas PJ kanalas (4 pav.) sudarytas iš dviejų puskanalių (koneksonų žr. 3 pav.), kurie savo ruožtu yra sudaryti iš šešių Cx koneksinų. Tarpląstelinėje sąveikoje dalyvaujančios plyšinės jungtys gali būti homotipinės (ląstelės išreiškia tą patį Cx izotipą), heterotipinės (ląstelės išreiškia skirtingus Cx izotipus) ir heteromerinės (bent viena ląstelė išreiškia du ar daugiau Cx izotipus). PJ kanalai skiriasi elektriniu laidumu, selektyviu pralaidumu, įvairiomis cheminėmis medžiagomis ir kanalų vartų jautrumu įtampai žr. [2].

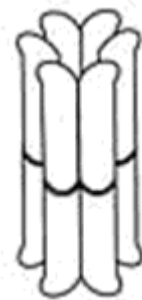
Koneksinai vadinami tapačiais, jeigu jie gali sudaryti funkcinis heterotipinius PJ kanalus. Dauguma Cx porų gali sudaryti funkcinės PJ, bet egzistuoja kai kurios išimtys. Pavyzdžiui: du pagrindiniai širdies koneksonai, Cx40 ir Cx43, kurie yra ekspresuoti širdyje ir kraujagyslėse, nėra tapatūs ir negali sudaryti funkcinių PJ kanalų žr. [3].



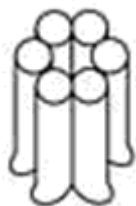
1 pav. Susidariusios tarpląstelinės plyšinės jungtys



2 pav. Koneksinas

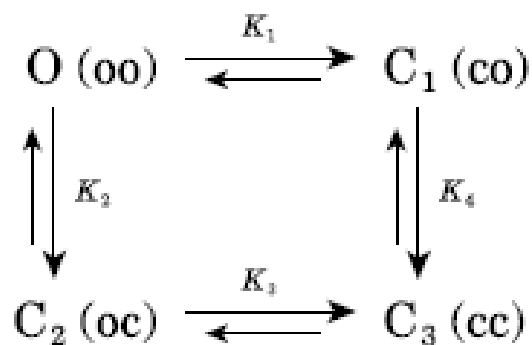


4 pav. Tarpląstelinis kanalas



3 pav. Koneksonas

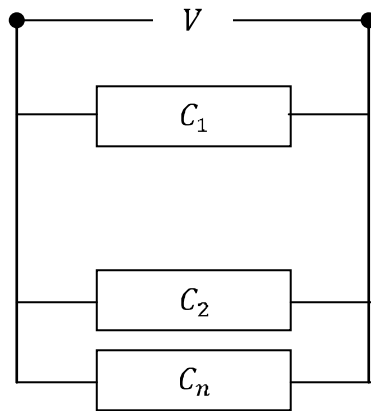
Bendra PJ savybė būdinga visiems Cx koneksinams yra kanalo vartų būsenos priklausomybė nuo įtampos. Jungties laidumas mažėja sudarius tarpląstelinės plyšinės jungties potencialą, V_j . Manoma, kad kiekvienas puskanalis turi du skirtingus vartų valdymo mechanizmus: lėtus, kuris uždaro PJ pilnai ir greitus, kuris perveda vartus į pereinamą būseną ar būsenas su liekamuoju laidumu. Mes skaitėme, kad kiekvienas puskanalis gali būti dviejose būsenose: atviroje su laidumu G_o ir uždarytoje su laidumu G_c . Vartų valdymo mechanizmai gali skirtis poliariškumu, tai yra vartai gali užsidaryti arba atsidaryti, jeigu citoplazmos pusėje potencialas didėja arba mažėja. Jeigu puskanalių vartai turi priešingą poliariškumą, vienas V_j poliariškumas atidarys abu puskanalius, o priešingas V_j potencialas uždarys abu puskanalius. 5 pav. pavaizduota pagrindinė schema, kuria buvo sudaromos perėjimo tikimybės iš [1] literatūros straipsnio.



5 pav. Perėjimų tikimybių pagrindinė schema

2.3 MODELIAI

Sistema susideda iš n lygiagrečiai sujungtų kanalų C_i , $i = \overline{1, n}$ apibūdinamų g_j laidumu. Kiekvienam iš jų per vienetinį diskretinį laiką yra paduodama įtampa V , į kurią kanalas sureaguoja ir suformuoja naują laidumą arba varžą. Schema yra pavaizduota 6 pav. Žemiau yra pateikti formalūs modelių aprašymai. Juos aprašinėju tiesiniu agregatiniu metodu [7].



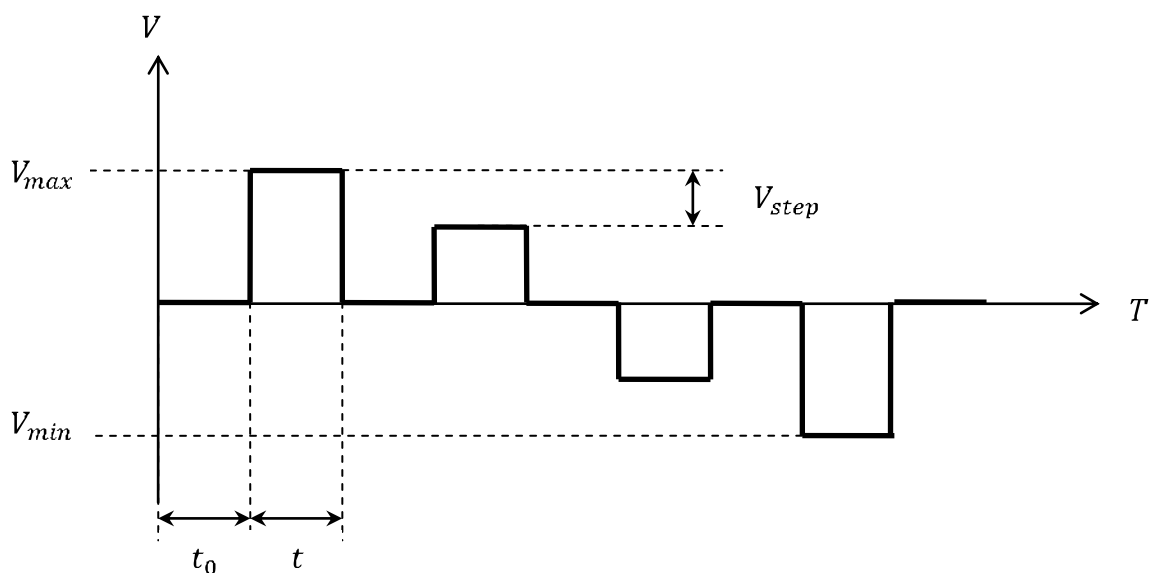
6 pav. Bendra modulių schema

Įtampos V padavimas kiekvienu laiko momentu priklauso nuo protokolo, su kuriuo modeliuojama. Dažniausiai yra naudojami keturi pagrindiniai protokoliai: “Steps”, “Ramps”, “Amplitude” ir “Impulse”. Kiekvienas iš jų yra aprašytas 2.3.1 skyriuje.

2.3.1 Protokoliai

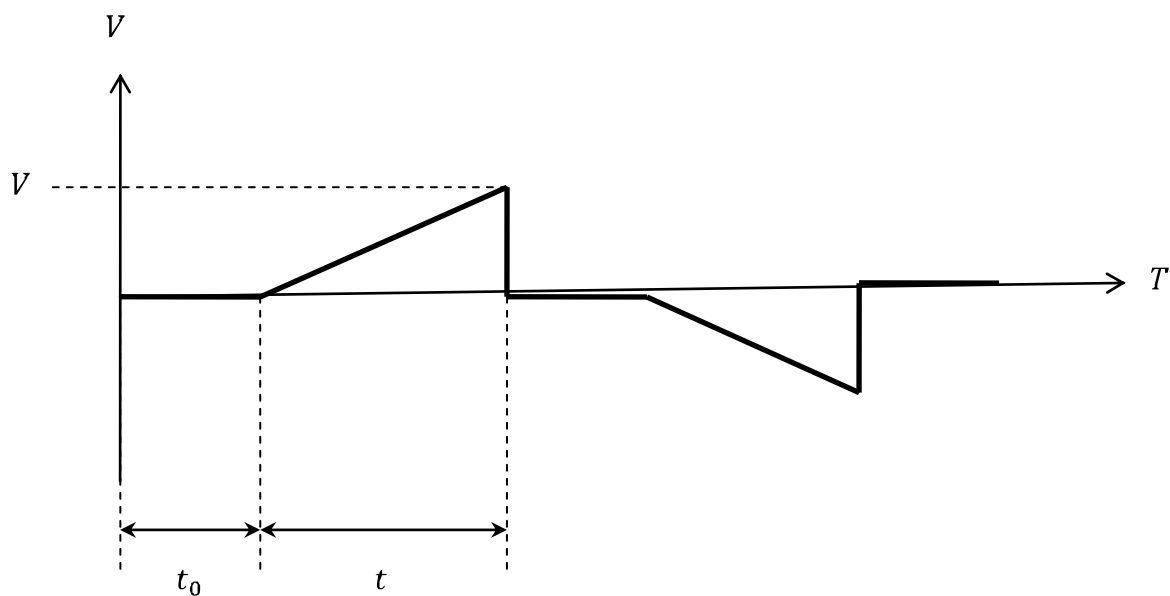
Protokoliai yra atsakingi už įtampos padavimą tam tikru diskrečiu laiko momentu. Šiame skyriuje mes aprašysime keturis užsakovų dažniausiai naudojamus protokolus.

„Steps“ – protokolas yra pavaizduotas 7 pav. Įtampos padavimas prasideda nuo 0 įtampa kuri laikoma t_0 laiką per kurį kanalai nusistovi iki ramios būsenos, po to paduodamas V įtampos šuolis kuris laikomas t laiką. V kinta nuo V_{max} iki V_{min} žingsniu V_{step} .



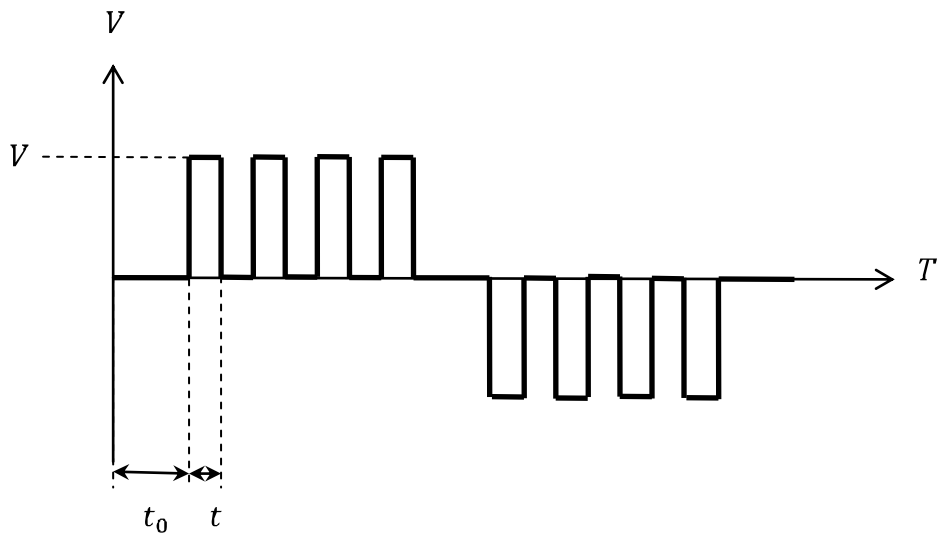
7 pav. „Step“ protokolo schema

„Ramps“ – protokolas yra pavaizduotas 8 pav. Įtampa 0 padavinėjama laiką t_0 , po kurio seka įtampos kilimas nuo 0 iki V , žingsniu $\frac{V}{t}$. Po to laukiama kol kanalai nusistovės į ramią būseną ir paduodamas įtampos smukimas iki $-V$.



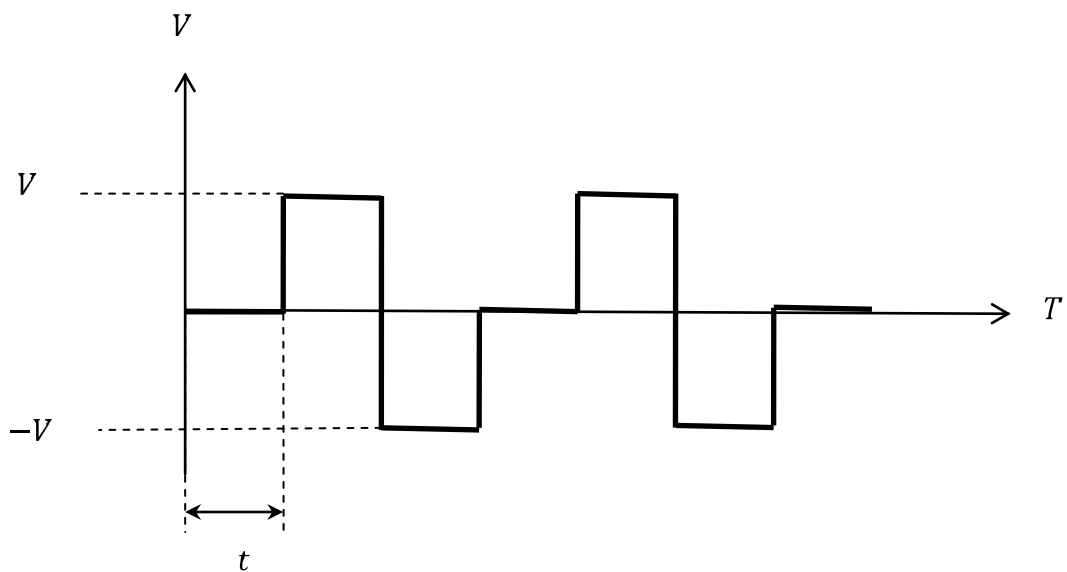
8 pav. „Ramps“ protokolo schema

„Amplitude“ – protokolas yra pavaizduotas 9 pav. 0 įtampa padavinėjama t_0 laiką po to seka n šuolių iki V įtampos ir 0, kurios yra padavinėjamos laiką t .



9 pav. „Amplitude“ protokolo schema

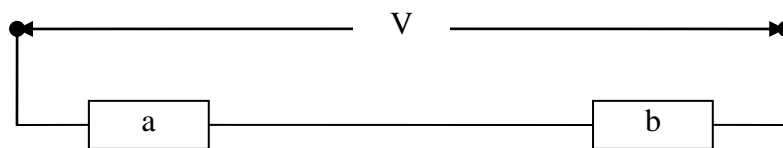
„Ramps“ – protokolas yra pavaizduotas 9 pav. Įtampa padavinėjama nuo 0 iki V ir iki $-V$ ir visos jos laikomos laiką t .



10 pav. „Ramps“ protokolo schema

2.3.2 2 vartų modelis

Šis modelis sudarytas iš dviejų nuosekliai sujungtų vartų a ir b (11 pav.), kurių kiekvienas turi savo kintantį laidumą. Kiekvienas vartas gali būti atviroje arba uždaroje būsenoje.



11 pav. 2 vartų modelio struktūra

Kiekvienas kanalo vartas apibūdinamos šiais parametrais: κ_j - perėjimo konstanta reguliuojanti varto būsenų kitimą, A_j - įtampos jautrumo koeficientas, V_{0j} - įtampos koeficientas, $G_{aj}(v)$ - atidaryto varto laidumo funkcija nuo įtampos, $G_{uj}(v)$ - uždaryto varto laidumo funkcija nuo įtampos.

Vartai gali būti vienoje iš dviejų būsenų: a arba u , kur a – atviri vartai, u – uždari vartai. Vartų būsenų kitimas vyksta diskrečiais laiko momentais t_i , $t_{i+1} = t_i + \Delta t$, $i = \overline{1, l}$, $l \Delta t = T$, kur T - modeliavimo laiko trukmė. Vartų būsenų kitimas parodytas 12 pav. Perėjimo tikimybės priklauso nuo vartų būsenos $s_j(t)$ ir įtampos $v_j(t)$, $j = \overline{1, 2}$, $t \in [0, T]$:

$$K_j(t_{m+1}) = e^{A_1(P_1 v_j - v_{01})},$$

$$Paa_j(t_{m+1}) = 1 - \frac{\kappa_j K_j(t_{m+1})}{1 + K_j(t_{m+1})},$$

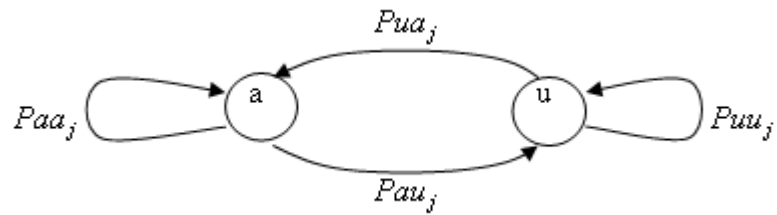
$$Pau_j(t_{m+1}) = \frac{\kappa_j K_j(t_{m+1})}{1 + K_j(t_{m+1})},$$

$$P_{ua_j}(t_{m+1}) = \frac{\kappa_j}{1 + \kappa_j(t_{m+1})},$$

$$P_{uu_j}(t_{m+1}) = 1 - \frac{\kappa_j}{1 + \kappa_j(t_{m+1})},$$

$$P_{aa_j}(t_{m+1}) + P_{au_j}(t_{m+1}) = 1,$$

$$P_{ua_j}(t_{m+1}) + P_{uu_j}(t_{m+1}) = 1.$$



12 pav. Vartų būsenų grafas

Vartų laidumas priklauso nuo vartų būsenos $s(t)_j$ ir pridėtos įtampos $V(t)$:

$$g_{a_j}(t) = \begin{cases} G_{a_j}(V_{a_j}(t)), & \text{jei } S_{a_j}(t) = a \\ G_{u_j}(V_{u_j}(t)), & \text{jei } S_{u_j}(t) = u \end{cases};$$

Čia $G(V)$ – varto laidumo funkcija, $S_j(t)$ - varto būseną, $V(t)$ - pridėta įtampa.

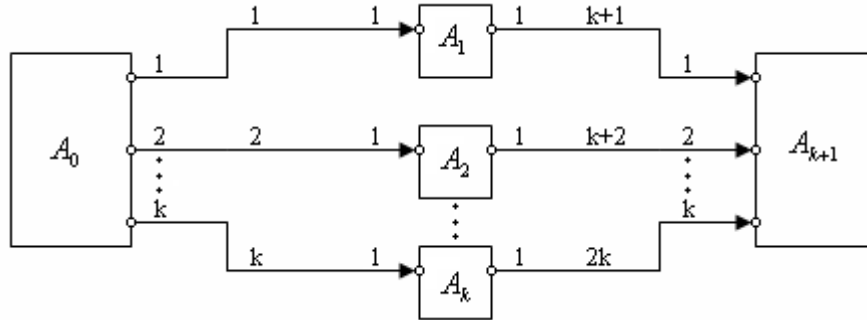
Vidutinis kanalų laidumas:

$$G_i(t) = \frac{\sum_{i=1}^n G_i(t)}{n} = \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^2 \frac{1}{g_{ij}}}{n};$$

Čia $G_i(t)$ - kanalo laidumas t laiko momentu, n – kanalų skaičius, g_{ij} - i - tojo kanalo j -jų vartų laidumas.

Sudaromas modelis turi leisti paskaičiuoti sistemos laidumą $G(t_i)$ laiko momentais t_i , $i = \overline{1, m}$, $t_{i+1} = t_i + \Delta t, m \Delta t = T$.

Agregatinis modelis



13 pav. Agregatinės sistemos schema

$$R = \begin{pmatrix} 1 & 2 & \dots & k & k+1 & k+2 & \dots & 2k \\ 1 & 2 & \dots & 1 & 1 & 2 & \dots & k \end{pmatrix}$$

$$H = \begin{pmatrix} 1 & 2 & \dots & k \\ k+1 & - & - & - \\ k+2 & - & - & - \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ 2k & - & - & - \end{pmatrix}$$

Agregato A_0 aprašymas

1. Išėjimo signalų aibė $Y = \{y_1, y_2, \dots, y_k\}$,

čia y_i - išduodama įtampa, $i = \overline{1, k}$.

2. Vidinių įvykių aibė $E'' = \{e''_1\}$,

čia e''_1 - išduodamas y_i signalas, $i = \overline{1, k}$.

3. Valdymo sekos $e''_1 \rightarrow \{\Delta t\}$,

čia Δt - laiko kitimo žingsnis.

4. Diskrečioji agregato būsenos dedamoji $v(t_m) = \{V(t_m)\}$,

čia $V(t_m)$ - įtampa t_m laiko momentu.

5. Tolydžioji agregato būsenos dedamoji $z_v(t_m) = \{w(e''_1, t_m)\}$,

čia $w(e''_1, t_m)$ - signalo išdavimo pabaigos momentas.

6. Pradinė būsena $t_0 = 0$, $z(t_0) = \{0, \Delta t\}$.

7. Parametrai:

$$V(t_l): T_l \rightarrow R$$

8. Perėjimo ir išėjimo operatoriai

$$H(e''_1):$$

$$v(t_{m+1}) = V(t_{m+1}),$$

$$t_m + \Delta t = t_{m+1},$$

$$w(e''_1, t_{m+1} = t_m + \Delta t).$$

$$G(e''_1):$$

$$y_i = V(t_{m+1}), \quad i = \overline{1, k}.$$

Agregato $A_i, i = \overline{1, k}$ aprašymas

1. Įėjimo signalų aibė $X = \{x_1\}$,

čia x_1 - paduodamos įtampos reikšmė.

2. Išėjimo signalų aibė $Y = \{y_1\}$,

čia y_1 - kanalo laidumo reikšmė.

3. Išorinių įvykių aibė $E' = \{e'_1\}$,

čia e'_1 - atėjo x_1 signalas.

4. Diskrečioji būsenos dedamoji $\nu(t_m) = \{Sa_j(t_m), t_m, ga_j(t_m)\}$, $j = \overline{1,4}$,

čia $Sa_j(t_m)$ - a_j vartų būseną t_m laiko momentu, $ga_j(t_m)$ - a_j vartų laidumas.

5. Pradinė būseną $t_0 = 0$, $\nu(t_0) = \{a, a, a, a, 0\}$

6. Parametrai:

κ_j - vartų perėjimo koeficientas, $j = \overline{1,4}$,

A_j - vartų jautrumo koeficientas, $j = \overline{1,4}$,

$V0_j$ - įtampos koeficientas, $j = \overline{1,4}$,

$Ga_j(v)$ - atidaryto vartų laidumo funkcija, $j = \overline{1,4}$,

$Gu_j(v)$ - uždaryto vartų laidumo funkcija, $j = \overline{1,4}$.

7. Perėjimo ir išėjimo operatoriai

$H(e'_1)$:

$$Sa_j(t_{m+1}) = \begin{cases} a, & \text{jei}(Sa_j(t_m) = a) \wedge (\xi \leq Paa_j(t_{m+1})) \\ u, & \text{jei}(Sa_j(t_m) = a) \wedge (Paa_j(t_{m+1}) < \xi \leq 1) \\ a, & \text{jei}(Sa_j(t_m) = u) \wedge (\xi \leq Pua_j(t_{m+1})) \\ u, & \text{jei}(Sa_j(t_m) = u) \wedge (Pua_j(t_{m+1}) < \xi \leq 1) \end{cases}$$

$$Va_j(t_{m+1}) = x_1 \frac{\frac{1}{ga_j(t_{m+1})}}{\sum_{k=1}^4 \frac{1}{ga_k(t_{m+1})}}$$

$$ga_j(t_{m+1}) = \begin{cases} Ga_j(Va_j(t_{m+1})), & \text{jei } Sa_j(t_{m+1}) = a \\ Gu_j(Va_j(t_{m+1})), & \text{jei } Sa_j(t_{m+1}) = u \end{cases}$$

$G(e'_1)$:

$$y_1 = \sum_{k=1}^4 \frac{1}{ga_k(t_{m+1})}.$$

Agregato A_{k+1} aprašymas

1. Įėjimo signalų aibė $X = \{x_1, x_2, \dots, x_k\}$,

čia x_i - i-tojo kanalo laidumas, $i = \overline{1, k}$.

2. Išėjimo signalų aibė $Y = \{y_1\}$,

čia y_1 - išduodamas laidumas.

3. Išorinių įvykių aibė $E' = \{e'_1, e'_2, \dots, e'_k\}$,

čia e'_i - atėjo x_i signalas.

4. Diskrečioji agregato būsenos dedamoji $\nu(t_m) = \{G_1(t_m), G_2(t_m), \dots, G_k(t_m)\}$,

čia $G_i(t_m)$ - i-tojo kanalo laidumas t_m - laiko momentu, $i = \overline{1, k}$.

5. Pradinė būsena $t_0 = 0$, $\nu(t_0) = \{0, 0, \dots, 0\}$

6. Perėjimo ir išėjimo operatoriai

$H(e'_1)$:

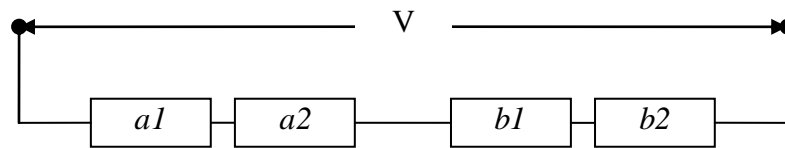
$$G_i(t_{m+1}) = G_i(t_m) + x_i$$

$G(e'_1)$:

$$G(t_{m+1}) = \frac{\sum_{i=1}^k G_i(t_m)}{n}, \text{ kai } t_m = t_{m+1}$$

2.3.3 4 vartų modelis

Šis modelis sudarytas iš keturių nuosekliai sujungtų vartų $a1$, $a2$, $b1$ ir $b2$, kurių kiekvienas turi savo kintantį laidumą 14 pav. Kiekvienas vartas gali būti atviroje arba uždaroje būsenoj

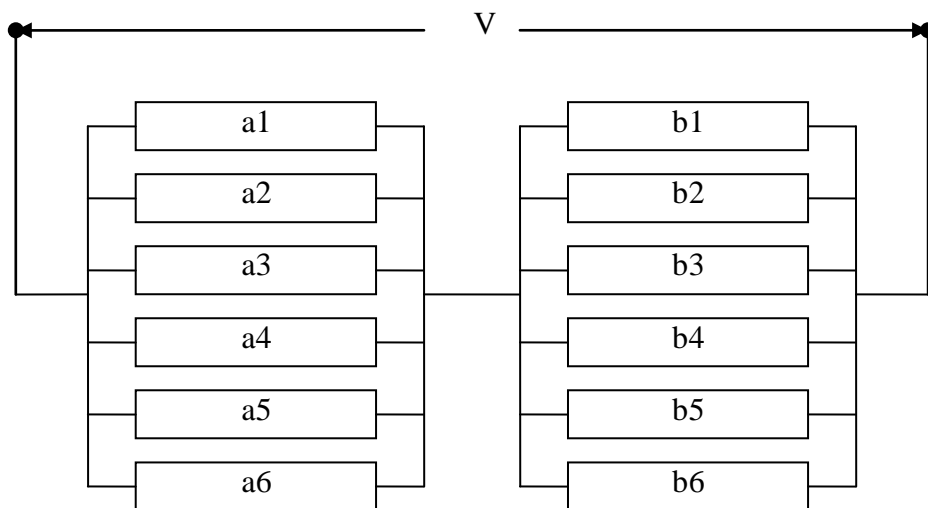


14 pav. 4 vartų modelio struktūra

Kadangi 4 vartų modelis beveik niekuo nesiskiria nuo 2 vartų modelio, todėl aš jo plačiau neaprašinėsiu. Jis yra identiškas 2 vartų modeliui, tik dabar yra lygiagrečiai sujungti 4 vartai.

2.3.4 6 koneksinų modelis

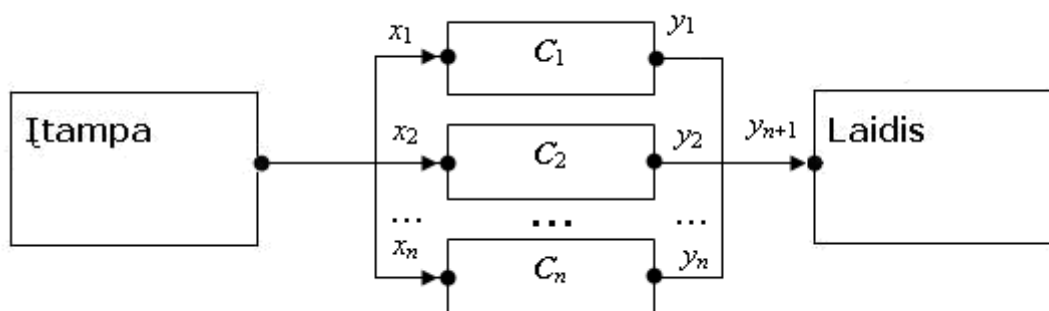
Šis modelis skiriasi nuo prieš tai aprašytų modelių. Kiekvienas puskanalis sudarytas iš 6 lygiagrečiai sujungtų modelių, kurių kairys ir dešinys puskanalis yra sujungtas nuosekliai (15 pav.).



15 pav. 6 koneksinų modelio struktūra

Kiekvienas koneksonas yra sudarytas iš lygiagrečiai sujungtų šešių vartų. Kiekvienas vartas gali būti dviejose būsenose: atviroj (Angl. Open), arba uždaroj (Angl. Closed). Tariama, kad koneksinai yra nepriklausomi vienas nuo kito.

Agregatinis modelis



16 pav. Pagrindinė kanalų agregatinė schema

Čia:

$C_i, i = 1, 2, \dots, n$ yra i -sis kanalas, sudarytas iš lygiagrečiai sujungtų šešių koneksinų ir nuosekliai prijungtos varžos.

Agregatas $C_i, i = 1, 2, \dots, n$:

1. Įėjimo signalų aibė $X = \{x_1\}$, kur $x = t(t_m) - i$ -tojo kanalo įtampa.
2. Išėjimo signalų aibė $Y = \{y_1\}$, kur y_1 – kanalo laidumas.
3. Išorinių įvykių aibė $E' = \{e'_1\}$, kur $e'_1 - i$ -tojo kanalo įtampos poveikis.
4. Vidinių įvykių aibė $E'' = \{e''_1\}$, kur $e''_1 - i$ - tojo kanalo naują būseną inicijuojantis įvykis.
5. Valdančioji seka $e''_1 \rightarrow \Delta t_1, \Delta t_2, \Delta t_3 \dots$, kur $\Delta t_1 = \Delta t = const$ – laiko intervalas, per kurį apskaičiuojama nauja kanalo būseną.
6. Diskrečioji agregato būseną laiko momentu t_m :

$$v_i(t_m) = \{u_i(t_m), u_{ilj}(t_m), u_r(t_m), s_{ilj}(t_m), g_i(t_m), g_{ilj}(t_m), g_r(t_m)\}, j = \overline{1,6}$$

Kur $u_i(t_m) - i$ -tojo kanalo įtampa,

$u_{ilj}(t_m) -$ kairiojo puskanalio koneksinų įtampa,

$u_r(t_m) -$ dešiniojo puskanalio įtampa,

$s_{ilj}(t_m) -$ kairiojo puskanalio koneksinų būsenos,

$g_i(t_m) - i$ -tojo kanalo laidumas,

$g_{ilj}(t_m) -$ kairiojo puskanalio koneksinų laidumai,

$g_r(t_m) -$ dešiniojo puskanalio laidumas.

7. Agregato būsenos tolydžioji dedamoji: $z_v(t_m) = \{w(e''_1, t_m)\}$, kur $w(e''_1, t_m) -$ laiko momentas, kurio metu apibrėžiama nauja kanalo būseną ir apskaičiuojamas laidumas.
8. Agregato pradinė būseną:

$$v(t_0) = \{u_i(t_0), u_r(t_0), u_{ilj}(t_0), s_{ilj}(t_0), g_i(t_0), g_r(t_0), g_{ilj}(t_0)\}, z_v(t_0) = \{\infty\}.$$

9. Perėjimų ($H(e'_1)$), ($H(e''_1)$) ir išėjimo ($G(e''_1)$) operatoriai tokie:

$H(e'_1)$:

$$w(e'_1, t_{m+1}) = t_m,$$

$$u(t_{m+1}) = x_1.$$

$H(e''_1)$:

$$s_{ilj}(t_{m+1}) = \begin{cases} o, (s_{ilj}(t_m) = o \wedge \xi < p_{oo}^{ilj}(t_m)) \vee (s_{ilj}(t_m) = c \wedge \xi < p_{co}^{ilj}(t_m)), \\ c, (s_{ilj}(t_m) = o \wedge p_{oo}^{ilj} \leq \xi \leq 1) \vee (s_{ilj}(t_m) = c \wedge p_{co}^{ilj} \leq \xi \leq 1) \end{cases}$$

tikimybės skaičiuojamos taip:

$$K_1 = e^{A_1 \cdot (-V - V_{o1})}$$

$$K_2 = e^{A_2 \cdot (-V - V_{o2})}$$

$$K_3 = e^{A_3 \cdot (-V - V_{o3})}$$

$$K_4 = e^{A_4 \cdot (-V - V_{o4})}$$

Tada tikimybė, kad koneksinas bus atviroje būsenoje yra skaičiuojama taip:

$$P_o = \frac{1}{(1 + K_1)(1 + K_2)} = \frac{1}{(1 + e^{A_1 \cdot (-V - V_{o1})})(1 + e^{A_2 \cdot (-V - V_{o2})})}$$

Čia A_1 - kanalo kairiojo puskanalio jautrio koeficientas;

A_2 - kanalo dešiniojo puskanalio jautrio koeficientas;

$$V_{o1}, V_{o2}$$

$$u_i(t_{m+1}) = u_i(t_m)g_i(t_m),$$

$$u_{il}(t_{m+1}) = \frac{u_i(t_{m+1})g_i(t_m)}{\sum_{j=1}^6 g_{ilj}(t_m)}$$

$$g_{ilj}(t_{m+1}) = f(s_{ilj}(t_{m+1}), u_{ilj}(t_{m+1})) = \begin{cases} \frac{Go}{6} e^{\frac{u_{ilj}}{V_h}}, & \text{if } s_{ilj}(t_{m+1}) = o, j = \overline{1,6} \\ \frac{Gc}{6} e^{\frac{u_{ilj}}{V_h}}, & \text{if } s_{ilj}(t_{m+1}) = c, j = \overline{1,6} \end{cases}$$

$$g_i(t_{m+1}) = \frac{g_r(t_{m+1}) \sum_{j=1}^6 g_{ilj}(t_{m+1})}{g_r(t_{m+1}) + \sum_{j=1}^6 g_{ilj}(t_{m+1})}$$

Čia g_r - dešiniojo puskanalio laidumas

$$w(e_1'', t_{m+1}) = t_m + \Delta t,$$

$G(e_1'')$:

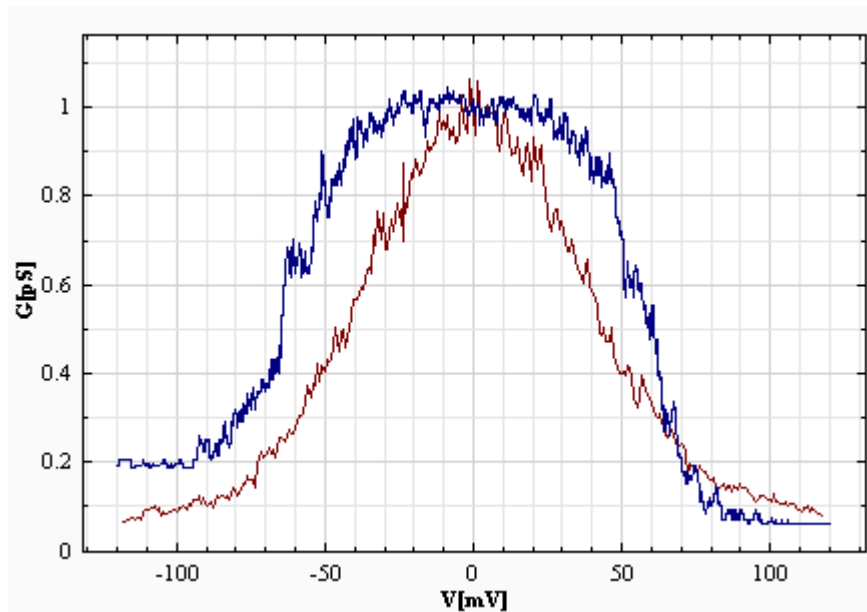
$$y_i = g_i(t_{m+1}).$$

2.4 PAIEŠKA

Pagrindinis sistemos uždavinys yra pagrįsti įvairias tarpląstelinių plyšinių jungčių kontaktavimo prielaidas pasinaudojant eksperimento bei imitacijos rezultatais. Todėl yra svarbu automatizuoti šį procesą, tai yra pasinaudojant eksperimentiniais rezultatais surasti imitacinės sistemos atitikmenį ir jos įėjimo parametrus.

Sistemos parametrų paieška yra labai svarbus uždavinys šioje sistemoje. Ji padėtų pagrįsti įvairias prielaidas ir surastų nežinomus parametrus įvairiems kanalų tipams.

Tarkime mes turime eksperimentinius nufiltruotus duomenis (17 pav., raudona kreivė) ir imitacijos rezultatus su tam tikrais įėjimo parametrais (17 pav., mėlyna kreivė). Mums reikia rasti imitacijos parametrus su kuriais imitacijos ir eksperimento kreivių kvadratų skirtumas bus mažiausias.



17 pav. Eksperimentiniai duomenys

Į šį uždavinį galima žiūrėti kaip į funkcijos aproksimavimą arba tiksliau šnekant regresiją, kai reikia surasti nežinomos funkcijos parametrus pagal taškų aibę. Mums reikia surasti mažiausią kvadratų skirtumą tarp eksperimentinių duomenų ir imitacinės sistemos.

2.4.1 Globalus optimizavimas

Pirma problema šiam uždaviniui spręsti yra triukšmo lygis kreivėse. Kadangi eksperimentų rezultatai neretai būna nukraipyti, bei atsiranda įvairių netikslumų susijusių su paklaidomis, metodais bei įranga, kuriuos naudoja eksperimentuose, todėl pradiniai eksperimento duomenys, prieš paduodant į paieškos sistemą bus išanalizuoti bei išfiltruoti siekiant tikslesnių paieškos rezultatų. Iš to seka, kad eksperimentinių duomenų triukšmo lygis bus pakankamai mažas, tačiau triukšmas egzistuos ir eksperimentų ir imitacijos rezultatuose, todėl reikia parinkti būdą jam sumažinti. Triukšmo lygio sumažinimas yra reikalingas, kad būtų galima gauti tikslesnę funkcijų mažiausių kvadratų skirtumą, nes kai triukšmas bus didelis, bus beveik neįmanoma surasti parametrų. Todėl vykdant paiešką mes turėsime abiem duomenims paskaičiuoti kvadratų skirtumą po 2 kartus. 1-as kartas sumažinant triukšmą pradinuose duomenys, o 2-as kartas įvertinant paieškos rezultatą.

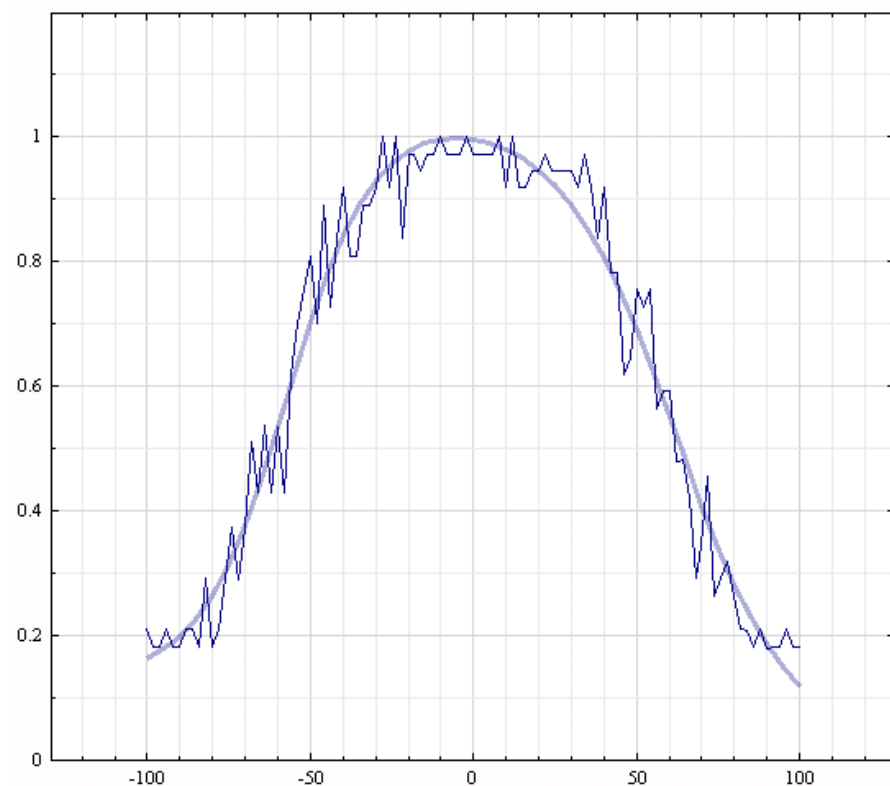
Šiai problemai spręsti galima naudoti netiesinę regresiją [6], kuri yra naudojama įvairiems uždaviniams spręsti statistikoje. Šiam atvejui galima naudoti „Boltzmano“ funkciją, kurią naudoja užsakovai analizuodami duomenis norėdami aproksimuoti funkciją:

$$a(V) = G \min_1 + \frac{G \max_1 - G \min_1}{1 + \exp^{A_1 * (V - V_{01})}};$$

$$b(V) = G \min_2 + \frac{G \max_2 - G \min_2}{1 + \exp^{A_2 * (V - V_{02})}};$$

$$F(V) = \frac{a(V) * b(V)}{a(V) + b(V)};$$

Pasinaudodami regresija mes galėsime gauti eksperimentų ir imitacijos rezultatų funkcijas be triukšmo ir tokių atveju galėsime tiksliau apskaičiuoti kvadratų skirtumą. Regresijos panaudojimo pavyzdys pavaizduotas 18 pav.



18 pav. Funkcijos aproksimavimas pasinaudojus nelinejine regresija

Naudodami $F(V)$ funkciją galima nesunkiai surasti jos parametrus pasinaudodami „Levenberg–Marquardt“ algoritmu. Tačiau problema iškyla, kai pradiniai funkcijos parametrai yra nutolę ir algoritmas nekonverguoja, tokiu atveju kvadratų skirtumas bus labai netikslus. Naudojant šią funkciją su esamu modeliu parametrai yra surandami, tačiau yra patobulinta funkcija, kurią galima naudoti norint aproksimuoti duomenis:

$$G_{\min_1}(V) = c_1 * \exp^{\frac{V}{c_1}};$$

$$G_{\max_1}(V) = d_1 * \exp^{\frac{V}{d_1}};$$

$$G_{\min_2}(V) = c_2 * \exp^{\frac{V}{c_2}};$$

$$G_{\max_2}(V) = d_2 * \exp^{\frac{V}{d_2}};$$

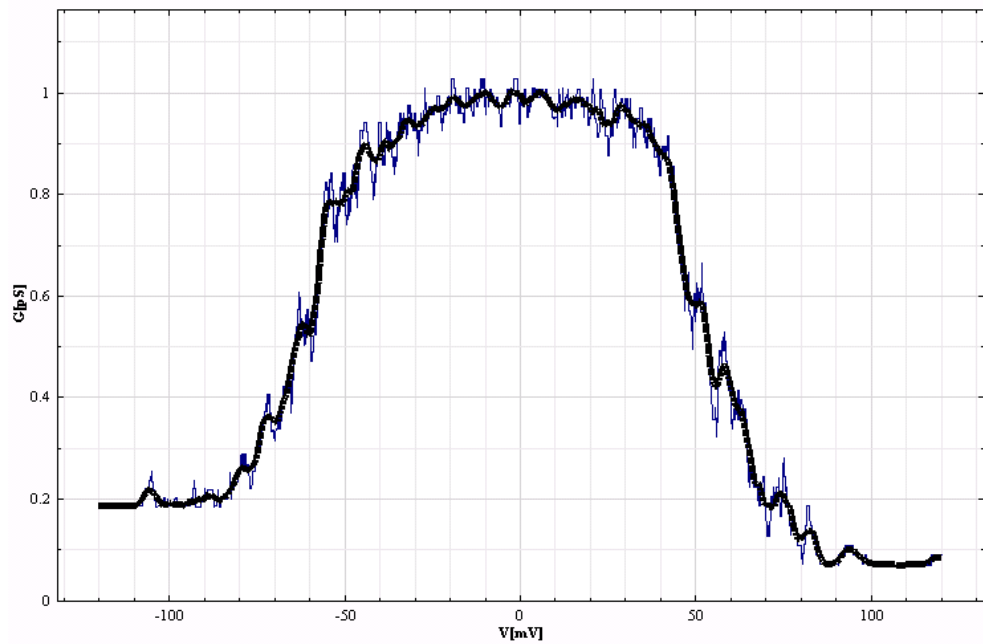
$$a(V) = G_{\min_1} + \frac{G_{\max_1} - G_{\min_1}}{1 + \exp^{A_1 * (V - V_{01})}};$$

$$b(V) = G_{\min_2} + \frac{G_{\max_2} - G_{\min_2}}{1 + \exp^{A_2 * (V - V_{02})}};$$

$$F(V) = \frac{a(V) * b(V)}{a(V) + b(V)};$$

Šioje funkcijoje yra pridėtas taip vadinamas ratifikavimas (angl. Ratification), kai laidumai kinta priklausomai nuo krintančios įtampos. Ši funkcija mūsų atveju būtų labai naudinga, nes yra modeliai su kuriais būtų galima vykdyti regresiją, tačiau ji visai nekonverguoja ir jos naudoti mes negalime. Todėl regresijos naudojimas triukšmui sumažinti atkrenta.

Triukšmui nuimti taip pat galime naudoti slenkantį kablelį (19 pav.), kuris sumažintų triukšmą. Kaip matome iš 19 pav. Triukšmo lygis yra sumažinamas, bet išlieka šiokių tokių iškraipymų. Šis variantas tinka triukšmo sumažinimui, nors ir palieka šiokį tokį triukšmą.

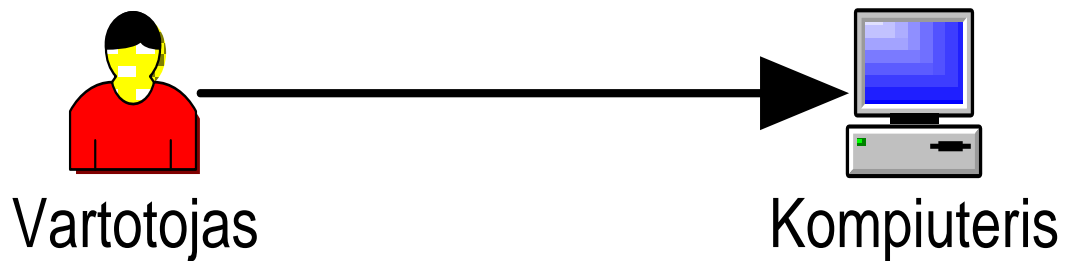


19 pav. Imitacijos rezultatai su triukšmo lygiu (mėlyna spalva) bei sumažintu triukšmo lygiu su slenkančiu kableliu (juoda spalva)

Paieškos vykdymui galime naudoti globalaus optimizavimo logaritmus [5]. Šie algoritmai yra naudojami įvairiems optimizavimo uždaviniams spręsti pvz.: Mokyklos tvarkaraščių sudarymui, keliaujančio pirklio ir t.t. Iš šių algoritmų buvo pasiūlyta naudoti „Exkor“ ir „Bayes“, todėl mes juos abu ir įgyvendinome.

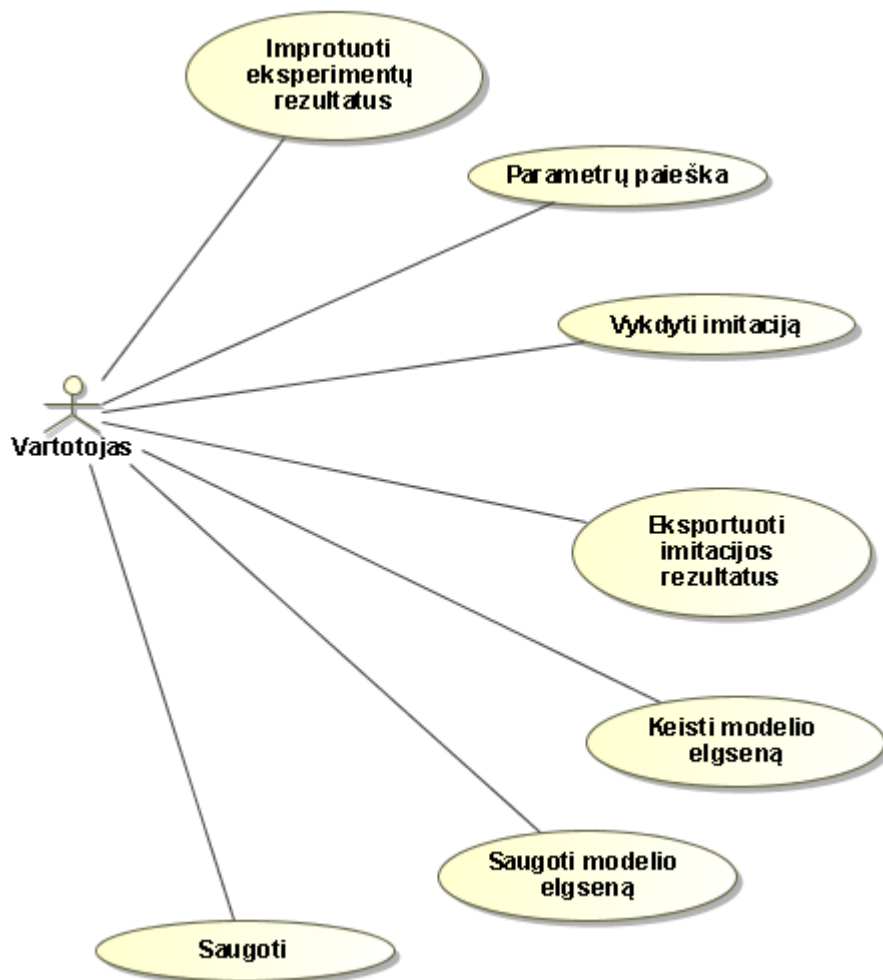
3 GJM SISTEMOS PROJEKTAVIMAS

Programinės įrangos sistemos kontekstas yra pavaizduotas 20 pav.



20 pav. Sistemos kontekstas

3.1 VARTOTOJO PANAUDOS ATVEJAI



1 lentelė. „Importuoti eksperimentų rezultatus“ panaudos atvejis

1. Panaudos atvejis	Importuoti eksperimentų rezultatus
Aktorius	Vartotojas
Aprašas	Eksperimentų rezultatai importuojami į sistemą
Prieš sąlyga	Nėra
Sužadinimo sąlyga	Vartotojas sąsajos meniu pasirinko eksperimentų importavimas funkciją
Po sąlyga	Sistema užkrauna duomenis ir pasiruošia parametų paieškai

2 lentelė. „Parametų paieška“ panaudos atvejis

2. Panaudos atvejis	Parametų paieška
Aktorius	Vartotojas
Aprašas	Ieškomi modelio parametrai
Prieš sąlyga	Importuojami eksperimentų duomenys
Sužadinimo sąlyga	Vartotojas programos sąsajoje pasirinko paieškos funkciją
Po sąlyga	Sistema suranda parametrus ir atvaizduoja rezultatus grafiškai

3 lentelė. „Vykdėti imitaciją“ panaudos atvejis

3. Panaudos atvejis	Vykdyti imitaciją
Aktorius	Vartotojas
Aprašas	Vykdoma imitacija pagal įvestu parametrus
Prieš sąlyga	Pasirenkamas ir užkraunamas protokolas
Sužadinimo sąlyga	Vartotojas programos sąsajoje pasirinko vykdymo funkciją
Po sąlyga	Sistema vykdo imitaciją ir atvaizduoja rezultatus grafiškai

4 lentelė. „Eksportuoti imitacijos rezultatus“ panaudos atvejis

4. Panaudos atvejis	Eksportuoti imitacijos rezultatus
Aktorius	Vartotojas
Aprašas	Rezultatai eksportuojami į rezultatų failą

Prieš sąlyga	Vykdoma imitacija arba parametų paieška
Sužadinimo sąlyga	Vartotojas programos sąsajoje pasirinko eksportuoti funkciją
Po sąlyga	Sistema išsaugo rezultatus į nurodytą failą

5 lentelė. „Keisti modelio elgseną“ panaudos atvejis

5. Panaudos atvejis	Keisti modelio elgseną
Aktorius	Vartotojas
Aprašas	Keičiama imitacinės sistemos modelio elgsena pasinaudojus matematinėmis išraiškomis
Prieš sąlyga	Užkrautas protokolas
Sužadinimo sąlyga	Vartotojas programos sąsajoje pasirinko elgsenos keitimo funkciją
Po sąlyga	Sistema pakeičia esamo protokolo elgseną

6 lentelė. „Saugoti modelio elgseną“ panaudos atvejis

6. Panaudos atvejis	Saugoti modelio elgseną
Aktorius	Vartotojas
Aprašas	Išsaugojama elgsena į nurodytą failą
Prieš sąlyga	Keičiama modelio elgsena
Sužadinimo sąlyga	Vartotojas programos sąsajoje pasirinko elgsenos saugojimo funkciją
Po sąlyga	Sistema išsaugo elgseną

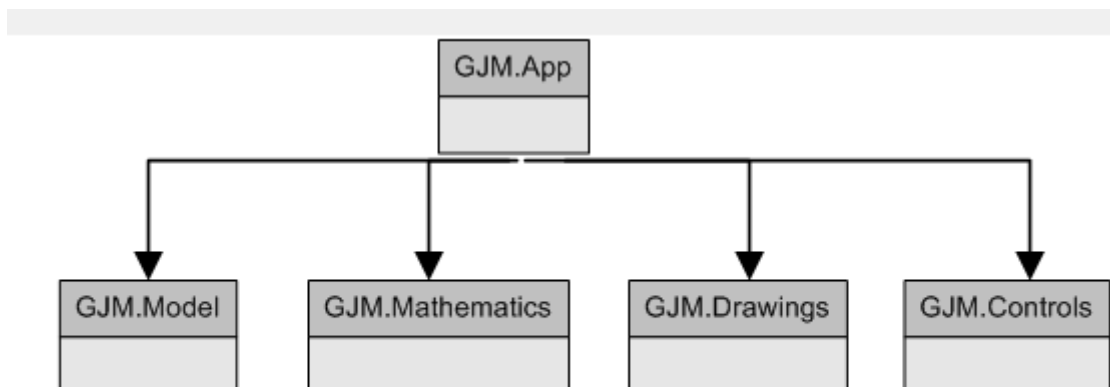
7 lentelė. „Saugoti“ panaudos atvejis

7. Panaudos atvejis	Saugoti
Aktorius	Vartotojas
Aprašas	Išsaugojama rezultatus
Prieš sąlyga	Vykdoma imitacija arba parametų paieška
Sužadinimo sąlyga	Vartotojas sąsajoje pasirinko saugojimo funkciją
Po sąlyga	Sistema išsaugo rezultatus

3.2 BENDRA MODULIŲ DIAGRAMA

Kuriama sistema susidarys iš šių modulių (22 pav.):

- „GJM.App“
- „GJM.Drawings“
- „GJM.Mathematics“
- „GJM.Model“
- „GJM.Controls“



22 pav. Bendra modulių diagrama

„GJM.Drawings“ komponentas

Klasifikacija:

Modulis

Apibrėžimas:

Komponentas yra reikalingas grafikų bei funkcijų atvaizdavimui. Jis bus pagrindinis komponentas atvaizduojant kuriamos sistemos rezultatus.

Atsakomybės:

Komponentas skirtas grafikų braižymui. Jis braižys funkcijas, leis vartotojui peržiūrėti bei išsaugoti grafikus. Taip pat jis bus vienas pagrindinių rezultatų peržiūros komponentas. Jame bus atitinkamos funkcijos leidžiančios vartotojams patogiai analizuoti rezultatus.

Apribojimai:

Komponentas turi veikti „thread safe“ režimu, kuris neleis panaudoti jos kintamųjų vykstant kelioms gijoms vienu metu.

Struktūra:

Išorinių komponentų šis komponentas nenaudos.

Sąveikavimas:

Komponentą naudos pagrindinė sistemos forma kuri bus atsakinga už visos programos darbą. Jos klasės bus paveldimos pridėdant papildomas funkcijas.

Resursai:

Resursų komponentas neturi.

Skaičiavimai:

Komponentas vykdo savo funkcijas greitai. Čia naudojami elementarūs skaičiavimai, kurių pagalba jis gali greitai atvaizduoti didelį kiekį duomenų.

Sąsaja:

Komponentas turės vieną klasę, kuri bus naudojama pagrindinėje formoje. Jis atvaizduos grafikus.

„GJM.Mathematics“ komponentas

Klasifikacija:

Modulis

Apibrėžimas:

Komponentas bus naudojamas matematinių išraiškų analizavimui, globalaus optimizavimo algoritmams bei papildomiems matematiniais skaičiavimams.

Atsakomybės:

Komponentas bus atsakingas už įvairius uždavinius susijusius su matematiniais skaičiavimais bei įvairiais algoritmais.

Apribojimai:

Komponentas turi veikti „thread safe“ režimu, kuris neleis panaudoti jos kintamųjų vykstant kelioms gijoms vienu metu.

Struktūra:

Išorinių komponentų šis komponentas nenaudos.

Sąveikavimas:

Komponentą naudos „GJM.App“ komponentas.

Resursai:

Resursų komponentas neturi.

Skaičiavimai:

Komponentas sukompiluoja išraiškas į tam tikrą objektą, kurio pagalba galima išgauti tos išraiškos rezultatą. Taip pat vykdo globalaus optimizavimo algoritmus.

Sąsaja:

Komponentas sąsajos neturės.

„GJM.Model“ komponentas**Klasifikacija:**

Modulis

Apibrėžimas:

Komponentas aprašo visas pagrindines struktūras bei objektus susijusius su tarpląstelinėmis plyšinėmis jungtimis. Taip pat vykdyt modelių skaičiavimus.

Atsakomybės:

Komponentas bus atsakingas už modelio vykdymą.

Apribojimai:

Komponentas turi veikti „thread safe“ režimu, kuris neleis panaudoti jos kintamųjų vykstant kelioms gijoms vienu metu.

Struktūra:

Komponentas naudos „GJM.Mathematics“ komponentą.

Sąveikavimas:

Komponentą naudos pagrindinė programos forma.

Resursai:

Resursų komponentas neturi.

Skaičiavimai:

Komponentas lygiagrečiai vykdys modelio imitaciją.

Sąsaja:

Komponentas sąsajos neturės.

„GJM.Controls“ komponentas

Klasifikacija:

Modulis

Apibrėžimas:

Komponentas bus naudojamas pagrindinės formos langų išdėstymui bei papildomiems grafinės sąsajos komponentams.

Atsakomybės:

Komponentas atsakingas už formos langų išsidėstymo valdymą.

Struktūra:

Komponentas išorinių komponentų nenaudos.

Sąveikavimas:

Komponentą naudos pagrindinė programos forma.

Resursai:

Komponentas resursų nenaudos.

Skaičiavimai:

Komponentas skaičiavimų neatlikinės.

Sąsaja:

Komponentas turės sąsajos komponentus, kuriuose bus dedami sistemos vidiniai komponentai.

„GJM.App“ komponentas**Klasifikacija:**

Vykdomoji programa

Apibrėžimas:

Pagrindinis vartotojo sąsajos langas.

Atsakomybės:

Komponentas atsakingas už visos programinės įrangos vykdymą.

Struktūra:

Komponentas naudos šiuos modulius: „GJM.Controls“, „GJM.Drawings“, „GJM.Model“, „GJM.Mathematics“.

Sąveikavimas:

Komponento niekas nenaudos.

Resursai:

Komponentas naudos resursų failą, kuris turės įvairius paveikslukus naudojamus vartotojo sąsajoje.

Skaičiavimai:

Komponentas leis skaičiavimus pasinaudodamas kitais moduliais.

Sąsaja:

Komponentas vaizduos pagrindinę vartotojo sąsają.

4 GJM SISTEMOS TYRIMAS

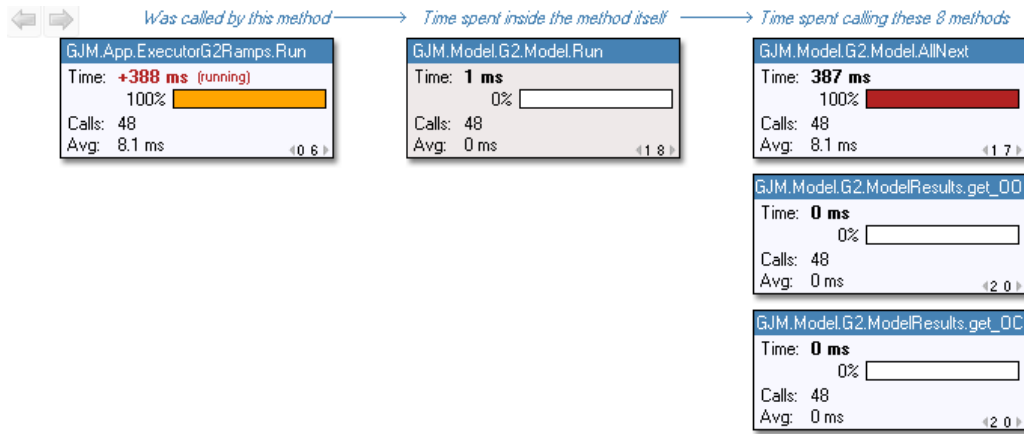
4.1 PROGRAMINĖS ĮRANGOS KOKYBĖ

Sudarant programinės įrangos kokybės tyrimą svarbiausia reikia suformuluoti tikslus. Kadangi modelių imitavimas susijęs su dideliais skaičiavimais, kurie gali įtakoti kitus veiksmus su šia programine įranga tokius kaip parametrų paieška, todėl reikia įsitikinti, kad modelio imitavimas veikia kaip įmanoma greičiau. Todėl reikia įvertinti imitacijos veikimo greitį ir apžvelgti programinį kodą, kuris buvo vykdomas ilgiausiai. Taip pat reikia įvertinti modelio veikimo teisingumą. Todėl kokybę tirsime šiais aspektais:

1. Peržiūrėsime programinio kodo veikimo charakteristikas
2. Sistemos plėtojimo galimybių apžvalga
3. Lygindami eksperimentinius duomenis su rezultatais
4. Peržvelgsime paieškos galimybes
5. Įvertinsime žmogaus intuiciją parametrų paieškoje

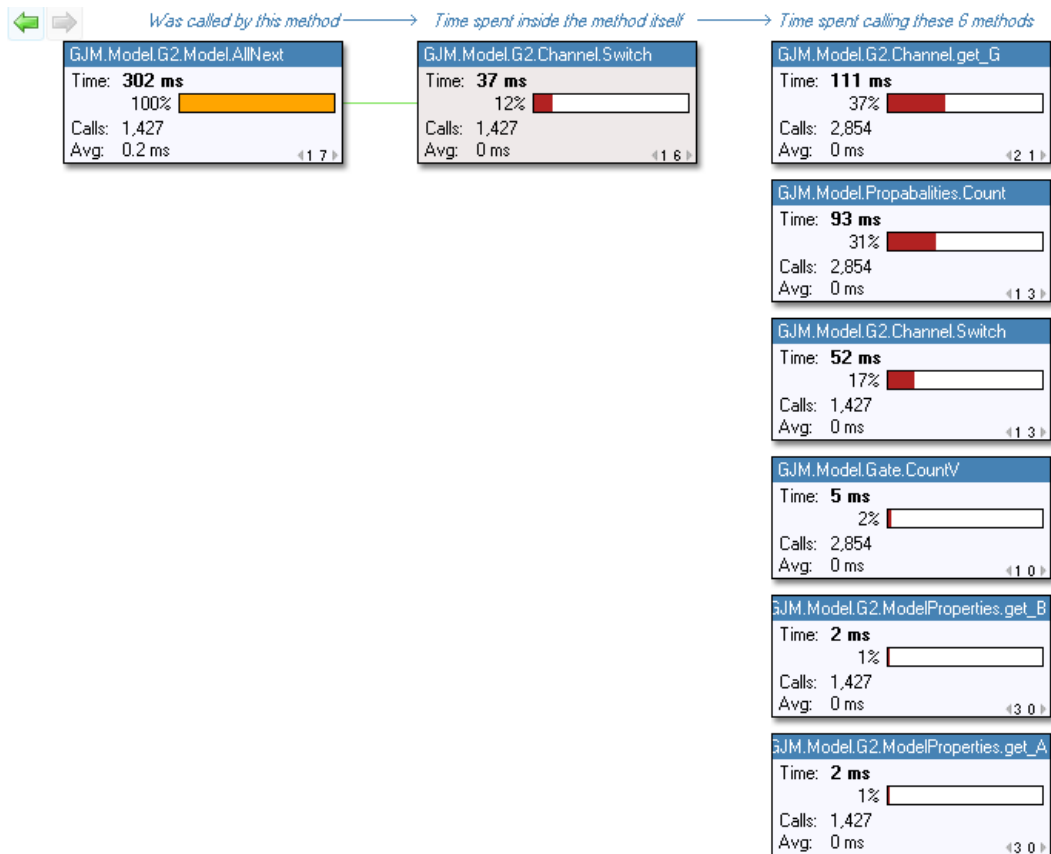
Pirmus 2 punktus apžvelgsime šiame skyriuje, likusios punktus apžvelgsim 5 skyriuje.

Programinio kodo veikimo charakteristikom peržiūrėti mes pasinaudosime „EQATEC Profiler“ įrankį, kuris skaičiuoja kviečiamų metodų laikus ir suranda ilgiausiai vykdomą programinį kodą. Šiam tyrimui atlikti paleisime 2 vartų modelio imitaciją ir surasime ilgiausiai vykdančius metodus.



23 pav. Programos veikimo statistika

Kaip matome 23 pav. yra pavaizduoti metodų veikimo laikai. Daugiausiai laiko užimantis metodas yra „GJM.Model.G2.ModelAllNext“. Toliau pasekus „AllNext“ ir „Switth“ metodu, mes gauname statistiką pavaizduotą 24 pav.



24 pav. „Switch“ metodo veikimo statistika

Taigi kaip matome yra trys daugiausiai laiko vykdantys skaičiavimus metodai, kuriuos reiktų patikrint ir peržiūrėti ar jie nevykdo nereikalingų arba perteklinių skaičiavimų. Patikrinus programinį kodą perteklinių skaičiavimų neradome šie metodai vykdė elementarius matematinius skaičiavimus, todėl galime teigti kad programinis kodas yra parašytas efektyviai.

Pasinaudodami tokiais įrankiais kaip „EQUATEC Profiler“ mes galime nesunkiai aptikti blogai veikiančią programinį kodą. Šis įrankis mums padėjo įvertinti programinio kodo efektyvumą, neskaitant algoritminės pusės.

4.2 SISTEMOS PLĖTOJIMAS

Kadangi yra dar daug nepagrįstų modelių, bei įvairių prielaidų pas užsakovus bei kitus tyrinėtojus, šią sistemą ketinama plėtoti bei daryti įvairius pataisymus. Taip pat šiuo metu paieška yra padaryta tik 2 vartų modeliui, tačiau ji bus įgyvendinta ir kituose modeliuose.

Taip pat yra planuojama leisti naudotis šia sistema visiems vartotojams, ir yra ketinama duoti prieigą prie jos.

Nors parametrų paieška suranda gana artimus eksperimentų atitikmenis, tačiau jis nėra pakankamai tikslus, su didesniu triukšmo lygiu tikslumas labai smarkiai sumažėja. Todėl parametrų paieškos optimizavimas bus toliau tobulinimas ir bus ieškoma greitesnių sprendimų, kurie padėtų greičiau aptikti eksperimentinių rezultatų atitikmenis.

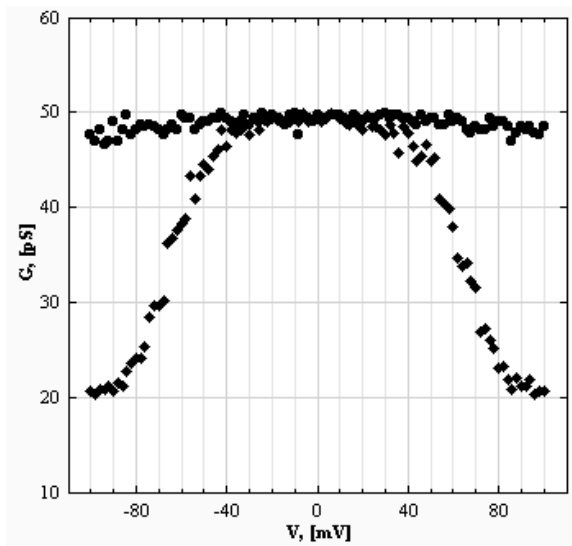
Iš anksčiau išvardintų punktų yra aišku, kad sistemos plėtojimo galimybių yra pakankamai daug, todėl ji toliau yra prižiūrima ir plečiama.

5 EKSPERIMENTAI IR IMITACINĖ SISTEMA

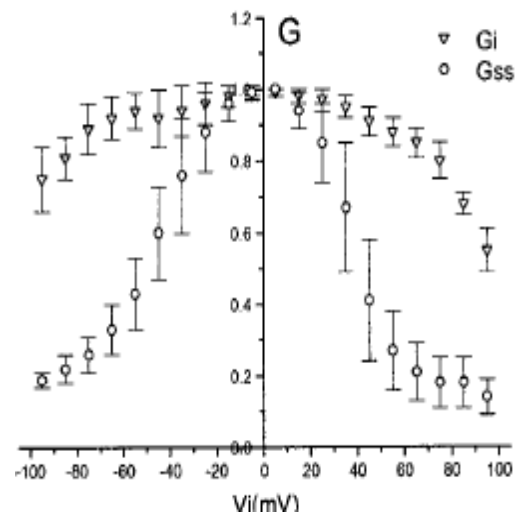
Prieš darant eksperimentus noriu pabrėžti, jog čia yra vaizduojami tik pagrindiniai sistemos išvedami duomenys, kurie parodo bendrą imitacijos, bei eksperimento rezultatą tai yra jos laidumą. Užsakovai nagrinėja ir tarpinius duomenis, kurie jiems yra taip pat labai svarbūs.

5.1 EKSPERIMENTŲ IR IMITACIJOS PALYGINIMAS

[1] straipsnyje yra aprašyti eksperimentai įvykdyti su skirtingais koneksonų tipais, todėl pasinaudoję jų gautais rezultatais mes pabandydysime palyginti imitacijos ir eksperimentų gautus rezultatus. Bet prieš tai noriu pasakyti, kad parametrai nėra tikslūs, ne visi yra žinomi ir yra nemažos paklaidos jose.



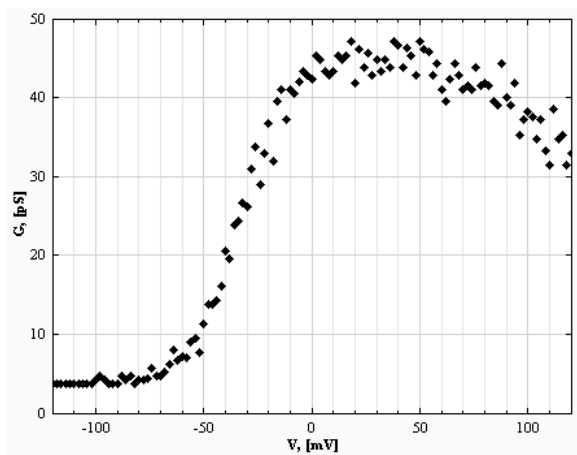
25 pav. Imitacijos rezultatai su Cx30/Cx30 koneksiniais



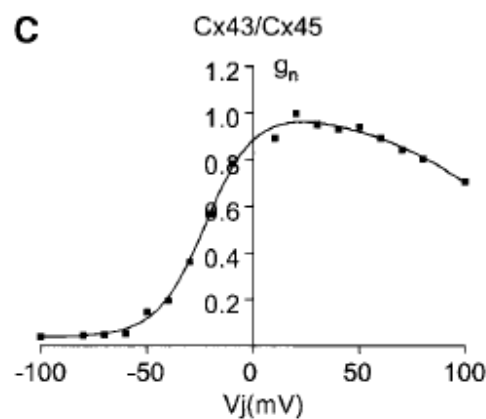
26 pav. Eksperimento rezultatai su Cx30/Cx30 koneksiniais

Kaip matome iš. 25 pav. ir 26 pav. šių rezultatų kreivės yra panašios, tačiau nevisai. Tai yra dėl to kad eksperimento duomenys yra jau sutvarkyti ir normalizuoti, o imitaciniuose rezultatuose yra atvaizduotas pilnas laidumas, kuris priklauso nuo kanalų skaičiaus. Šioje imitacijoje naudojome 1000 kanalų su tokiais parametrais:

$$\begin{array}{ll}
 A_1 = 0,116; & A_2 = 0,116; \\
 V_{01} = 41.5; & V_{02} = 41.5; \\
 G_{o1} = 1; & G_{o2} = 1; \\
 G_{c1} = 0.25 & G_{c2} = 0.25
 \end{array}$$



27 pav. Cx43/Cx45 koneksonų imitacijos rezultatai



28 pav. Cx43/Cx45 koneksonų eksperimento rezultatai

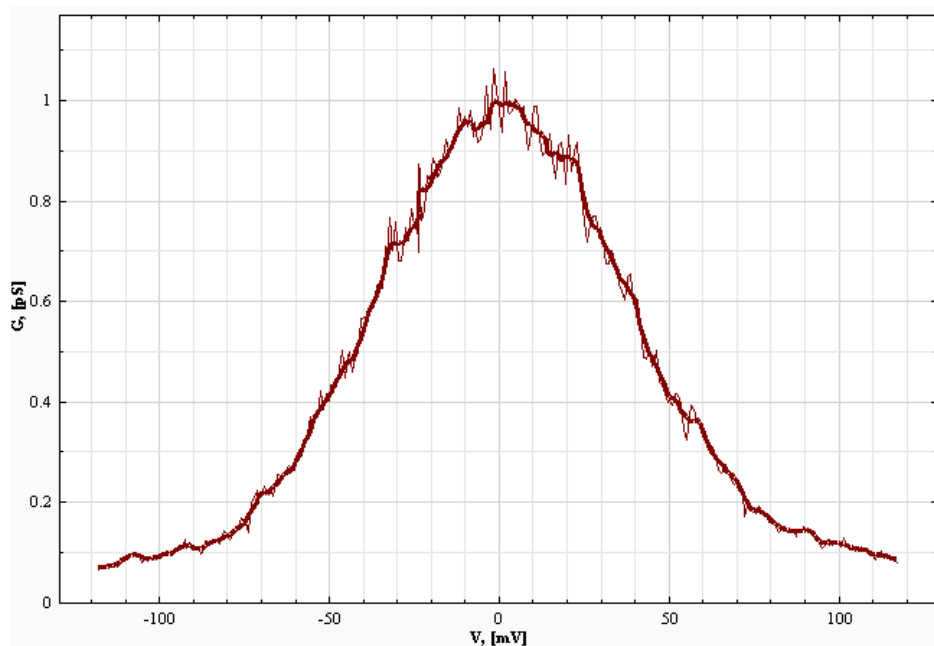
27 pav. ir 28 pav. matome Cx43/Cx45 gautus rezultatus. Šis pavyzdys yra tinkamesnis, nes aiškiau yra matomas kreivių panašumas. Kaip matome rezultatai sutampa. Šiame eksperimente leidome 1000 kanalų su tokiais parametrais:

$$\begin{array}{ll}
 A_1 = 0.088; & A_2 = 0.027; \\
 V_{01} = 22.3; & V_{01} = 125.3; \\
 G_{o1} = 1.03; & G_{o1} = 1.03; \\
 G_{c1} = 0.04 & G_{c1} = 0.04
 \end{array}$$

Kaip matome iš šių eksperimentų imitacijos ir eksperimento rezultatai yra panašūs. Yra viena problema atskirų koneksinų parametrai yra labai retai žinomi ir nelabai tikslūs, todėl ir gavosi 1-as eksperimentas su šokia tokia paklaida. Literatūros [9] straipsnį yra pateiktas tarpląstelių plyšinių jungčių modelio pradinis variantas. Jame matosi jog senesnis modelis buvo mažiau tikslus nei dabartiniai. Taip pat [10] straipsnį yra demonstruojamas tikslesnis rezultatų palyginimas ne tik su pagrindiniais duomenimis, jame yra parodomi eksperimentų ir imitacijos palyginimai su lėtais ir greitais vartais.

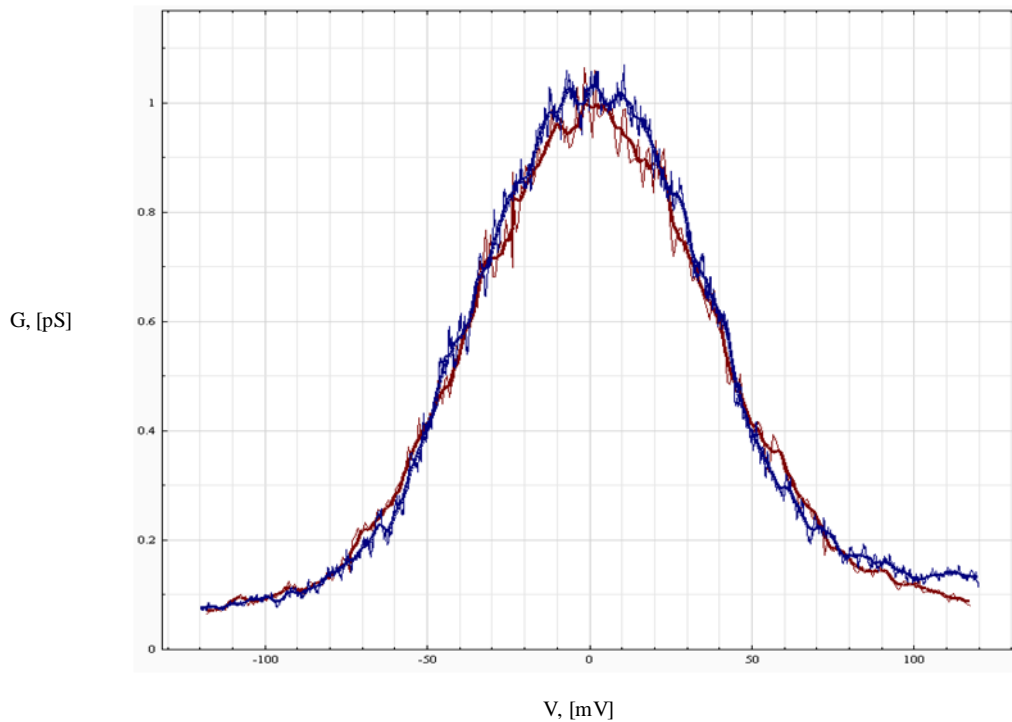
5.2 GLOBALUS OPTIMIZAVIMAS

Globalaus optimizavimo arba paieškos eksperimentai yra labai svarbūs šiame darbe, todėl dabar padarysime keletą eksperimentų. Pradžioje pabandysime surasti realių eksperimentų atitikmenis. Šiam eksperimentui mes iš užsakovų gavome realius nufiltruotus duomenis, kurie yra pavaizduoti 29 pav. Plona linija vaizduoja gautus duomenis, o paryškinta vaizduoja filtravimą pritaikius slenkantį kabelį.



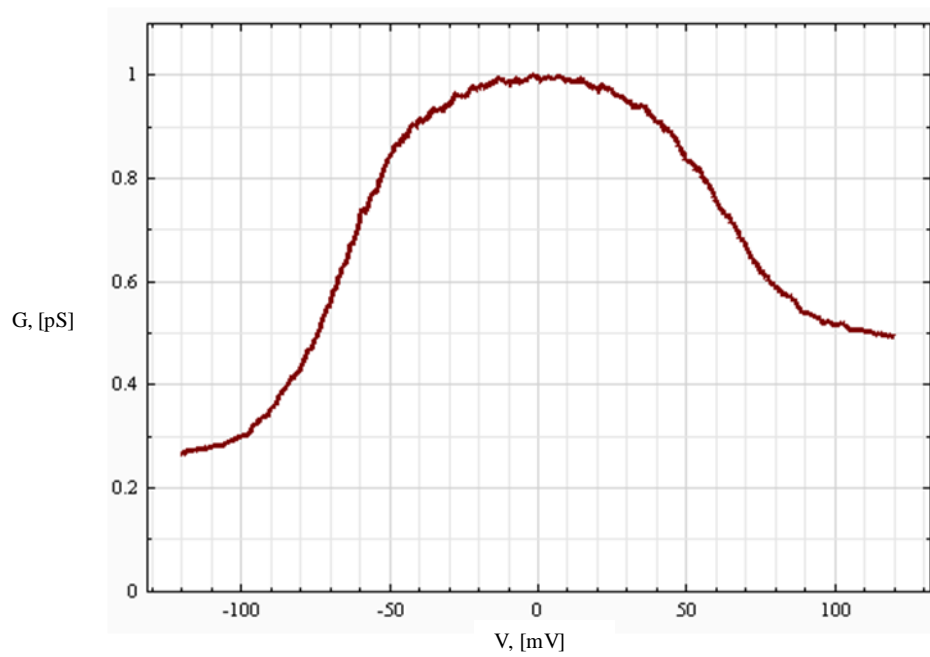
29 pav. Eksperimentiniai duomenys

Šiam eksperimentui naudosime 1000, kanalų tam, kad gautume tikslesnius rezultatus. Taigi po 3 valandų mes gauname rezultatą pavaizduotą 30 pav. Kaip matome rezultatai yra pakankamai tikslūs nepaisant esamo triukšmo lygio.

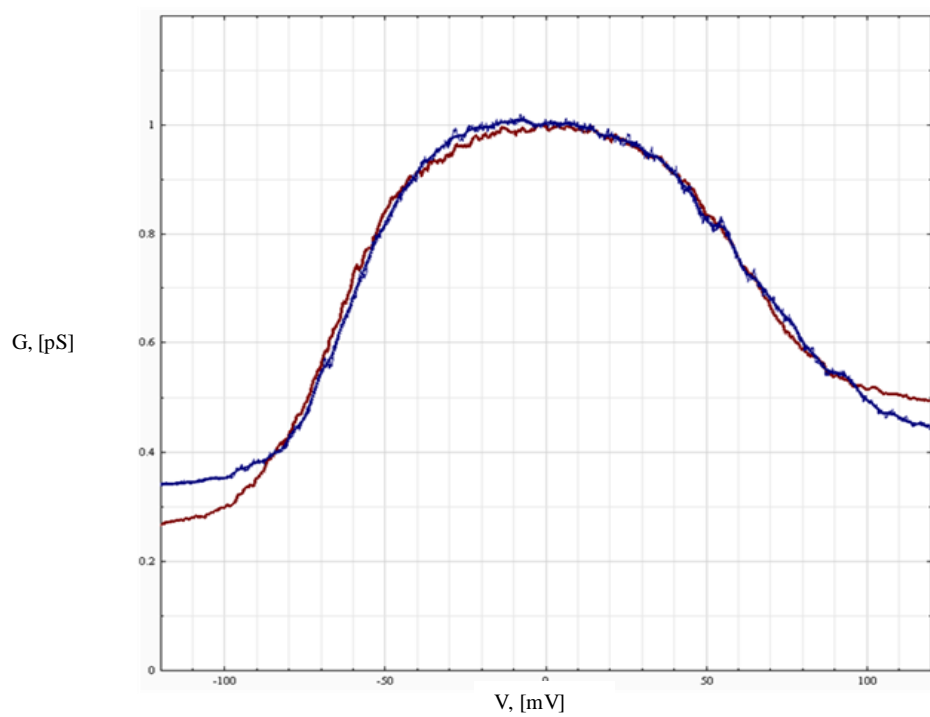


30 pav. Gauti rezultatai po 3 valandų

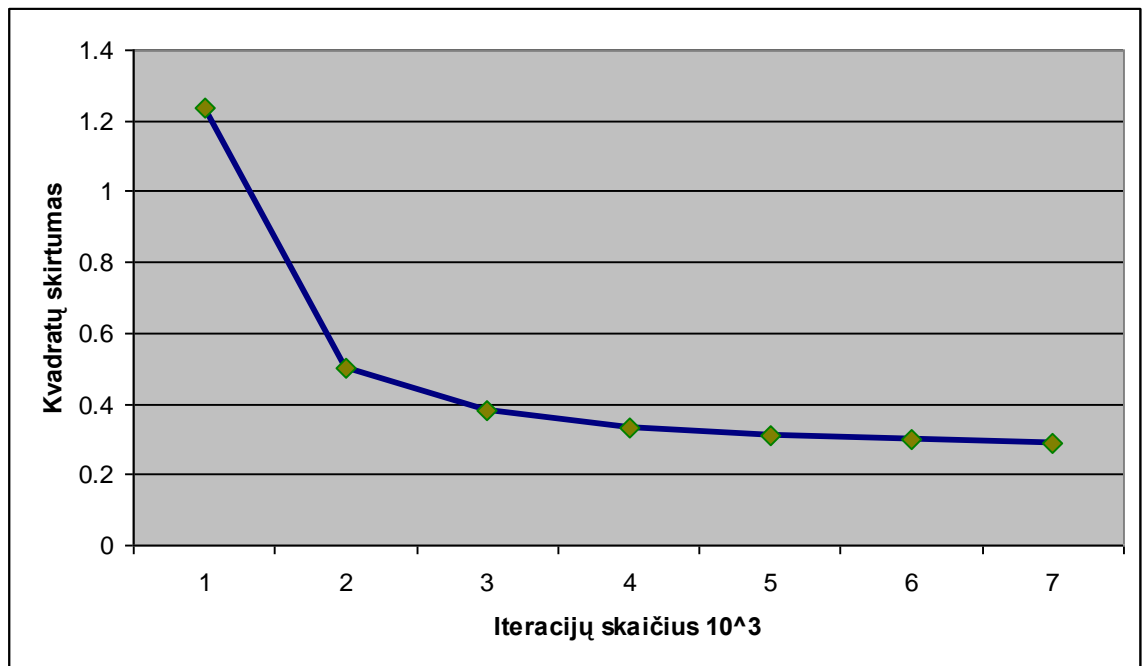
Dabar pabandysime įvertinti paieškos tikslumą. Kadangi šia tyrimui reikia tikslių duomenų, tai yra su kuo mažesniu triukšmu, todėl mes naudosime pačios sistemos gautus rezultatus su 1000 kanalų (31 pav.), kurios surasta kreivė po 5000 iteracijų yra pavaizduota 32 pav.



31 pav. Duomenys gauti panaudojus imitacine sistema



32 pav. Rezultatai gauti po 5000 iteracijų



33 pav. Mažiausių kvadratų skirtumo priklausomybė nuo iteracijų skaičiaus

Iš 33 pav. galime daryti išvadą, kad kvadratų skirtumas nuo iteracijų skaičiaus mažėja eksponentiškai link 0, todėl vykdant paiešką yra labai sunku prieiti prie norimo rezultato, ypač jei yra padidėjęs triukšmo lygis tiek eksperimentuose tiek imitaciniuose rezultatuose.

5.3 ŽMOGIŠKASIS FAKTORIUS

Yra labai dažnas atvejis kai žmogus gali atlikti kai kuriuos skaičiavimus pasinaudodamas savo nuojauta. Todėl nusprendžiau patyrinėti kaip greitai žmogus gali surasti eksperimentinius duomenis. Kadangi reikia žmonių, kurie gerai supranta sistemą bei sprendžiamą problemą, nusprendžiau paimti užsakovą ir save. 1 Lentelėje surašiau laikus, per kurį buvo surasti eksperimentinių duomenų atitikmenys pagal 31 pav. pavaizduotą eksperimentą.

Uždavinio sprendėjas	Laikas
Sistemos programuotojas	35 min.

Užsakovas	20 min.
Kompiuteris	68 min.

1 Lentelė. 31 pav. sprendžiamo uždavinio laikai

Kaip matome suradimo laikas priklauso nuo modelio supratingumo lygio. Tai yra užsakovas, kuris daugiausiai naudojasi sistema suranda panašius atitikmenis kaip ir kompiuteris per daug trumpesnę laiką. Todėl žmogiškoji nuojauta tokioje sistemoje yra labai svarbi ir ieškant sudėtingesnių eksperimentų atitikmenis be žmogaus nesurasime.

Sistemos programuotojas išmano sistema, tačiau negali taip greitai surasti atitikmenų kaip pats užsakovas. Todėl galima daryti prielaidą, jog paieška be žmogaus įsikišimo yra nereikšminga sprendžiant sudėtingesnius uždavinius.

Kaip matome tam tikros žinios gali smarkiai paspartinti paieškos sistemą, nors šiuo metu paieškos greitis yra pakankamai geras, tačiau likę modeliai yra sudėtingesni ir jų veikimas užtrunka 2 ar net 4 kartus ilgiau, todėl paieška bus vykdoma dar ilgiau, todėl yra manoma jog genetinis arba neuroninis programavimas [8] čia gali padaryti didelę įtaką. Jie gali smarkiai pagreitinti paieška

6 IŠVADOS

1. Sukurta PJ imitacinė sistema, leidžianti imituoti 2 vartų, 4 vartų ir 6 koneksinų modelius.
2. Kuriant PJ imitacinius modelius reikia optimaliai parinkti modelio parametrus, kad modeliavimo rezultatai minimaliai skirtųsi nuo eksperimentų rezultatų. Imitacinio modelio parametrų parinkimui buvo panaudotos globalaus optimizavimo procedūros.
3. Sukurti PJ modeliai adekvačiai atvaizduoja elektrofiziologinius procesus plyšinėje jungtyje. Tai patvirtino imitacinio modelio rezultatų palyginimas su eksperimentiniais rezultatais gautais iš Niujorko, Yeshiva universiteto, Alberto Einšteino koledžo laboratorijos.
4. Įvertinome programinio kodo efektyvumą pasinaudodami „EQUATIC Profiler“ įrankiu, su kuriuo paskaičiavome programinio kodo vykdymo laikus ir nesunkiai aptikome ilgiausiai trunkančius metodus, bei įvertinome jų efektyvumą.
5. Įvertinome GJM sistemos plėtojimo galimybes, bei aptarėme ateities planus.

7 LITERATŪRA

1. Ye Chen-Izu, Alonso P. Moreno and Robert A. Spangler. Opposing gates model for voltage gating of gap junctions channels. Prieiga internete:
<http://ajpcell.physiology.org/cgi/content/abstract/281/5/C1604>.
2. Feliksas F. Bukauskas, Angelė Bukauskienė, Vytas K. Verselis and Michael V. L Bennett. Coupling asymmetry of heterotypic connexin 45/ connexin 43-EGFP gap junctions: Properties of fast and slow gating mechanisms. Prieiga internete:
<http://www.ionchannels.org/showabstract.php?pmid=12011467>.
3. Mindaugas Račkauskas, Maria M. Kreuzberg, Mindaugas Pranevičius, Klaus Willecke, Vytas K. Verselis and Feliksas Bukauskas. Gating properties of Heterotypic Gap Junction Channels Formed of connexin 40, 43 and 45. Biophysical Journal, 2007.
4. Computer simulation. Prieiga internete:
http://en.wikipedia.org/wiki/Computer_simulation.
5. Globalaus optimizavimo pavyzdžiai. Prieiga internete: <http://soften.ktu.lt/~mockus/>.
6. Nonlinear estimation. Prieiga internete:
<http://www.statsoft.com/textbook/stnonlin.html>
7. H. Pranevičius. Kompiuterinių tinklų formalusis specifیکavimas: agregatinis metodas. Kaunas. Technologija, 2003, 2004.
8. A. Verikas, A. Gelžinis. Neuroniniai tinklai ir neuroniniai skaičiavimai. Kaunas. Technologija, 2003.
9. Mindaugas Pranevičius, Feliksas Bukauskas, Henrikas Pranevičius ir Nerijus Paulauskas. Imitacinis tarpląstelių plyšinių jungčių vartų modeliavimas. Informacinės technologijos, Kaunas, 2007.
10. Nerijus Paulauskas, Mindaugas Pranevičius, Henrikas Pranevičius, and Feliksas F. Bukauskas. A Stochastic Four-State Model of Contingent Gating of Gap Junction Channels Containing Two ‘Fast’ Gates Sensitive to Transjunctional Voltage. Biophysical Journal, 2009.

8 TERMINŲ IR SANTRUMPŲ ŽODYNAS

GJM – formalus imitacinės sistemos pavadinimas (Gap Junction Model).

PJ – plyšinės jungtys.

Cx – Koneksinai, dažnai rašomi su numeriu priekyje nusakančiu jo rūšį pvz.: Cx30, Cx32.

Protokolas – aprašo įtampos kitimą, kuri kiekvienu laiko momentu paduodama kanalui.

9 PRIEDAS

1. Nerijus Paulauskas, Mindaugas Pranevičius, Henrikas Pranevičius, and Feliksas F. Bukauskas. A Stochastic Four-State Model of Contingent Gating of Gap Junction Channels Containing Two ‘‘Fast’’ Gates Sensitive to Transjunctional Voltage. *Biophysical Journal*, 2009.
2. Mindaugas Pranevičius, Feliksas Bukauskas, Henrikas Pranevičius ir Nerijus Paulauskas. Imitacinis tarpląstelinių plyšinių jungčių vartų modeliavimas. *Informacinės technologijos*, Kaunas, 2007.

A Stochastic Four-State Model of Contingent Gating of Gap Junction Channels Containing Two “Fast” Gates Sensitive to Transjunctional Voltage

Nerijus Paulauskas,^{†§} Mindaugas Pranevicius,[‡] Henrikas Pranevicius,[§] and Feliksas F. Bukauskas^{†*}

[†]Dominick P. Purpura Department of Neuroscience, and [‡]Anesthesiology, Albert Einstein College of Medicine, The Bronx, New York; and [§]Kaunas University of Technology, Kaunas, Lithuania

ABSTRACT Connexins, a family of membrane proteins, form gap junction (GJ) channels that provide a direct pathway for electrical and metabolic signaling between cells. We developed a stochastic four-state model describing gating properties of homotypic and heterotypic GJ channels each composed of two hemichannels (connexons). GJ channel contain two “fast” gates (one per hemichannel) oriented opposite in respect to applied transjunctional voltage (V_j). The model uses a formal scheme of piece-linear aggregate and accounts for voltage distribution inside the pore of the channel depending on the state, unitary conductances and gating properties of each hemichannel. We assume that each hemichannel can be in the open state with conductance $g_{h,o}$ and in the residual state with conductance $g_{h,res}$, and that both $g_{h,o}$ and $g_{h,res}$ rectifies. Gates can exhibit the same or different gating polarities. Gating of each hemichannel is determined by the fraction of V_j that falls across the hemichannel, and takes into account contingent gating when gating of one hemichannel depends on the state of apposed hemichannel. At the single-channel level, the model revealed the relationship between unitary conductances of hemichannels and GJ channels and how this relationship is affected by $g_{h,o}$ and $g_{h,res}$ rectification. Simulation of junctions containing up to several thousands of homotypic or heterotypic GJs has been used to reproduce experimentally measured macroscopic junctional current and V_j -dependent gating of GJs formed from different connexin isoforms. V_j -gating was simulated by imitating several frequently used experimental protocols: 1), consecutive V_j steps rising in amplitude, 2), slowly rising V_j ramps, and 3), series of V_j steps of high frequency. The model was used to predict V_j -gating of heterotypic GJs from characteristics of corresponding homotypic channels. The model allowed us to identify the parameters of V_j -gates under which small changes in the difference of holding potentials between cells forming heterotypic junctions effectively modulates cell-to-cell signaling from bidirectional to unidirectional. The proposed model can also be used to simulate gating properties of unapposed hemichannels.

INTRODUCTION

Connexins (Cx), a large family of membrane proteins, form gap junction (GJ) channels that provide a direct pathway for electrical and metabolic signaling between cells. Each GJ channel is composed of two hemichannels, hexamers of Cxs also called connexons. Cell-cell communication can be organized through homotypic (same Cx isoform in both hemichannels), heterotypic (two Cx isoforms form GJ channels, but each hemichannel is assembled from one isoform) and heteromeric (different Cx isoforms form at least one hemichannel) GJ channels that vary in conductance, perm-selectivity, and gating properties. Gap junctional communication play important roles in many processes, such as impulse propagation in the heart, communication between neurons and glia, metabolic exchange between cells in the lens that lack blood system, organ formation during development, and regulation of cells proliferation (reviewed in (1–4)).

A property that appears to be common to GJ channels formed of any Cx isoform is sensitivity of junctional conductance, g_j , to transjunctional voltage, V_j (5,6). A common

feature of V_j -gating is that steady-state g_j ($g_{j,ss}$) does not decline to zero with increasing V_j , but reaches a plateau or residual conductance that varies from ~5% to 30% of the maximum g_j depending on the Cx isoforms (7). Single-channel studies have shown that residual g_j is due at least in part to incomplete closure of the GJ channel by V_j , i.e., V_j causes channels to close to a subconductance (residual) state with fast gating transitions (~1 ms and less), which has significantly longer dwelling time than other substates (7,8). The symmetric reduction in g_j with positive or negative V_j has been explained by having a V_j gate in each apposed hemichannel so that for each polarity of V_j , closure can be ascribed to one or the other hemichannel (9). It was shown that V_j as well as chemical uncouplers can also induce gating transitions to the fully closed state and that these transitions are slow, ~10 ms (10,11). Gating to different levels via distinct fast and slow gating transitions led to the suggestion that there are two distinct V_j sensitive gates, termed fast and slow or “loop” gating mechanisms (reviewed in (12)). The fast gate closes channels to the residual state and it is mainly operated by V_j , whereas the slow gate closes channels completely and it is operated primarily by chemical uncouplers but also by V_j .

Earlier, gating properties of GJ channels were described by using Boltzmann function (9,13) assuming that GJ channels have two states, open and fully closed, as most of ionic

Submitted August 25, 2008, and accepted for publication January 14, 2009.

Nerijus Paulauskas and Mindaugas Pranevicius contributed equally to this work.

*Correspondence: fbukausk@aecom.yu.edu

Editor: Benoit Roux.

© 2009 by the Biophysical Society
0006-3495/09/05/3936/13 \$2.00

doi: 10.1016/j.bpj.2009.01.059

channels. To find gating parameters, g_j - V_j dependence was split into two segments for positive and negative V_j s. Such approach allowed to describe gating properties of homotypic and heterotypic GJ channels assuming that each hemichannel gates independently, which may be accurate only when both hemichannels have the same gating polarity, have similar single-channel conductance, and are relatively insensitive to V_j . Previously there were few attempts to describe V_j gating of GJs at the single-channel level (14) and macroscopically (15) by using a four-state model in which each hemichannel contained a fast gate operating between open and residual states. Both models made a progress introducing a more detailed description of GJ channels based on most recent experimental data and improved the fitting process allowing to find gating parameters of GJ channels. However, the analytical approach used in (15) to describe V_j -gating allowed only steady-state predictions. Neither of the previous models allowed the possibility to study kinetics of junctional current during applied transjunctional voltages. Ramanan et al. (16) proposed a three-state model of Cx37 GJ channels that exhibits the main state and two substates. This model was adapted more specifically to GJ channels that demonstrate multiple substates.

Here we present a stochastic four-state model that uses imitative approach and accounts for voltage distribution inside the pore of the GJ channel, i.e., takes into account contingent gating. Each hemichannel contains a fast gating mechanism with variable gating polarity. Each gate can be in open or closed states that correspond to the open state or the residual state, respectively, of the hemichannel. In addition, unitary conductances of open and residual states depend on V_j , i.e., conductance of hemichannels rectifies. The model was used to imitate experimental data of V_j -gating in homotypic and heterotypic junctions measured in HeLa cells exogenously expressing different Cx isoforms. Our model allowed simulation of the dynamics of junctional current that was achieved due to use of stochastic description of voltage gating processes. This enhanced flexibility of the model in respect to its structure and variation of parameters used to describe the conductance and gating of hemichannels composing GJ channel.

MATERIAL AND METHODS

Cells and culture conditions

Experiments were performed using HeLa cells (Human cervix carcinoma cells, ATCC CCL2) stably transfected with different Cx isoforms (Cx31, Cx40, Cx43, Cx45, and Cx47). More details about used DNAs for transfection and selection of clones stably expressing different Cx isoforms are in (17–19). Cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 8% fetal calf serum (Gibco, Carlsbad, CA), 100 mg/ml streptomycin and 100 units/ml penicillin.

Electrophysiological measurements

Experiments were performed in modified Krebs-Ringer solution containing (in mM): NaCl, 140; KCl, 4; CaCl₂, 2; MgCl₂, 1; glucose, 5; pyruvate,

2; HEPES, 5 (pH 7.4). Electrodes were filled with pipette solution containing (in mM): KCl, 130; NaAsp, 10; MgATP, 3; MgCl₂, 1; CaCl₂, 0.2; EGTA, 2; HEPES, 5 (pH 7.2). For electrophysiological recordings, cells were grown onto glass coverslips and transferred to an experimental chamber mounted on the stage of an inverted microscope IX70 (Olympus, Center Valley, PA). Cells were perfused with modified Krebs-Ringer solution at room temperature. Junctional conductance (g_j) was measured in selected cell pairs using the dual whole-cell patch clamp system (20). Briefly, each cell within a pair was voltage clamped independently with a separate patch clamp amplifier (EPC-7plus; HEKA). Transjunctional voltage (V_j) was induced by stepping the voltage in cell-1 (DV_1) and keeping the other constant, $V_1 \frac{1}{2} DV_1$. Junctional current (I_j) was measured as the change in current in the unstepped cell-2, $I_2 \frac{1}{2} DI_2$. Thus, g_j was obtained from the ratio, $\Delta I_j / V_j$, where negative sign indicates that junctional current measured in cell-2 is oppositely oriented to the one measured in cell-1. Signals were acquired and analyzed using custom-made software (21) and A/D converter from National Instruments (Austin, TX).

RESULTS

Initially, we will highlight the experimental data demonstrating basic properties of GJs that we used in the model. This includes micro- and macroscopic V_j -gating events, single GJ channel gating transitions between open and residual states, and their rectification. Subsequently, we will describe the model and simulate V_j -gating in homo- and heterotypic junctions composed of different numbers of GJ channels. Finally, we will simulate signal transfer asymmetry in response to electrical activity of high frequency applied to either side of heterotypic junctions.

Conductance and voltage gating properties of GJ channels formed from different Cx isoforms

Typically, homotypic GJ channels exhibit g_j decay in response to V_j and symmetric g_{ss} - V_j dependence. Fig. 1 A shows I_j through Cx47 homotypic channels evoked by negative V_j steps of 31, 48, and 65 mV. Short and repeated voltage steps of ΔE 18 mV (see the inset) were used to measure g_j in between of long V_j steps. During V_j steps of Δ 48 and Δ 65 mV, I_j decayed from an initial value (I_{in}) to a steady-state level (I_{ss}). Fig. 1 B shows averaged and normalized G_{in} and G_{ss} (normalized to g_j at $V_j \frac{1}{2}$ 0 mV) dependencies on V_j . G_{in} - V_j plot (solid circles; dashed line is a regression line of the second order) shows virtually no changes of G_{in} over V_j range from Δ 110 to 110 mV. G_{ss} - V_j plot demonstrates symmetric bell-shape dependence on V_j that is typical for homotypic GJ channels. The solid line is a fit of G_{ss} data to Boltzmann's equation (13). The fit was performed separately for g_{ss} data at positive and negative V_j s. Fig. 1 C shows variation of G_{ss} - V_j dependence among different Cx isoforms forming homotypic GJ channels.

Fig. 2 shows I_j record of HeLaCx47 cell pair exhibiting one functional channel. Solid gray lines show that during first two ramps, the channel is open and I_j is virtually linear over applied V_j s. At the beginning of the third ramp, channel closes from the open state to the substate or the residual state and remains closed during period indicated in the box. The inset shows that I_j - V_j relationship is not linear and rectifies

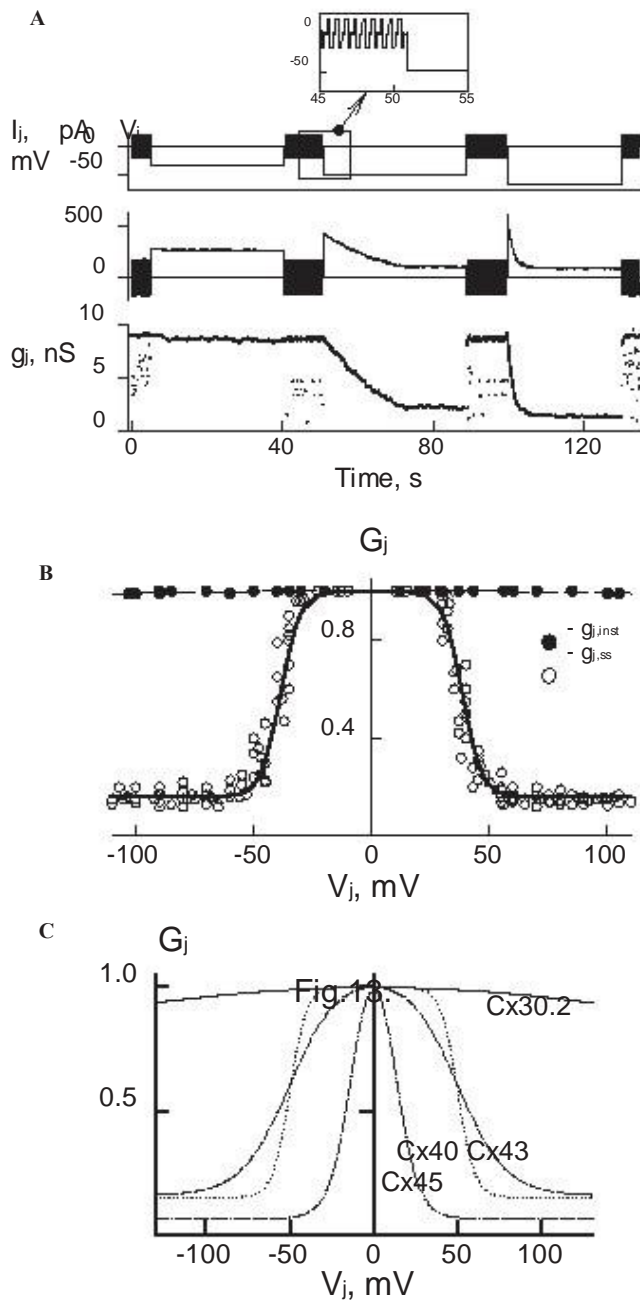


FIGURE 1 Illustration of voltage gating in HeLa cells expressing different Cx isoforms. (A) An example of I_j decay in homotypic Cx47 channels evoked by negative V_j steps of 31, 48, and 65 mV. Repeated voltage steps of ± 18 mV (see the inset) were used to measure g_j in between of long V_j steps. (B) Dependencies of G_{in} and G_{ss} (normalized to g_j at $V_j = 0$ mV) on V_j in Cx47 homotypic GJs. (C) G_{ss} - V_j plots of different Cx isoforms forming homotypic GJ channels.

almost exponentially. The rectification of the residual conductance was shown earlier for Cx43 (22) and Cx32 (23) GJ channels. The rectification of the open state is problematic to monitor in homotypic GJ channels because conductances of apposed hemichannels are oriented as mirror images of each other.

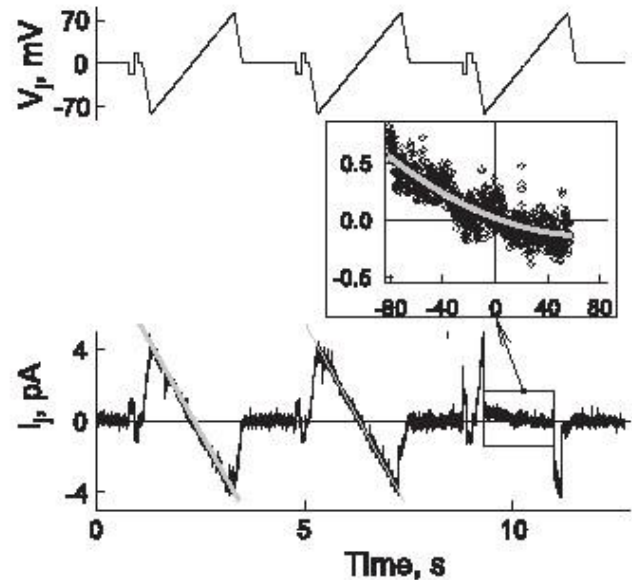


FIGURE 2 Illustration of the rectification of the residual conductance in HeLaCx47 cell pair exhibiting one functional channel. Solid gray lines on I_j trace show that during first two ramps the channel is open, and I_j is virtually linear over entire V_j range. During the third ramp, the channel was closed to the residual state over time indicated in the box. The inset shows that I_j - V_j relationship of the residual state is not linear, i.e., rectifies.

Otherwise, $g_{n,o}$ rectification was well documented in unapposed hemichannels of Cx30, Cx46, and Cx50 (24,25).

Heterotypic GJ channels that form between cells expressing different connexins (each cell expresses one Cx isoform) typically exhibits asymmetric V_j -gating. Fig. 3 A shows currents through Cx43/Cx45 heterotypic GJ channels at V_j ramps from ± 60 to ± 60 mV applied to HeLaCx43 cell. At positive V_j s the channel exhibits gating transitions between open and closed states, whereas at negative V_j s the channel stays open. Summarized I_j - V_j plot shows that I_j of the open state is virtually linear over V_j , that the channel exhibits strong V_j -gating asymmetry and that gating transitions were observed preferentially at V_j s negative on Cx45 side. This is in agreement with our previous report demonstrating that the gating polarity of Cx45 is negative (26). However, not all heterotypic junctions show linear I_j - V_j relationship for the open state. Fig. 3 B shows I_j record of the single Cx32/Cx46 heterotypic channel in response to repeated series of V_j steps and ramps. Summarized I_j - V_j plot shows that the open state demonstrates very strong rectification (the solid gray line is a fit of the data points representing the open state to the exponential function); I_j at $V_j = \pm 90$ mV is ~ 3 -fold smaller than at $V_j = \pm 90$ mV.

Fig. 4 shows V_j -gating of Cx31/Cx45 heterotypic junction examined by using voltage ramps with slow rise of V_j over time. The I_j trace shows strong asymmetry, similar to that reported earlier (27), in response to two V_j ramps of different polarity. Earlier, we reported that in some heterotypic GJs an asymmetry of g_j - V_j plots is higher than predicted from intrinsic V_j -gating sensitivities of Cxs composing heterotypic

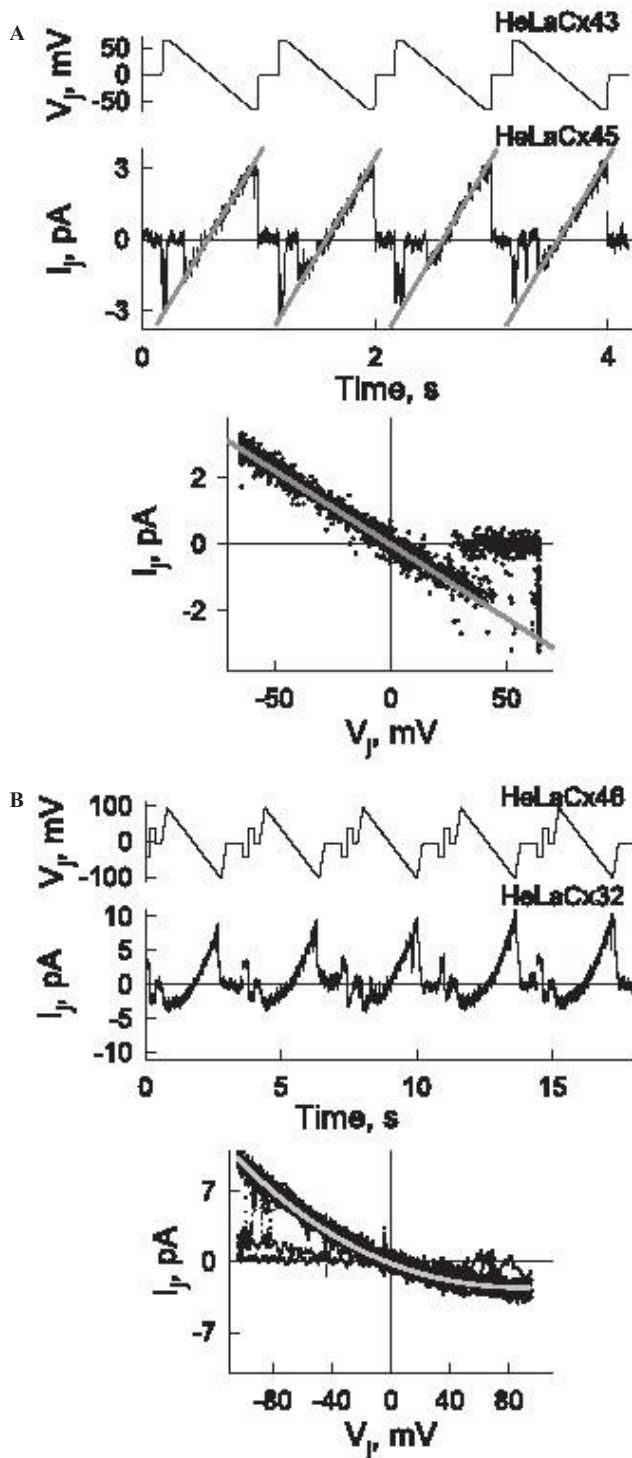


FIGURE 3 I_j recordings at the single-channel level demonstrating an absence and presence of I_j - V_j rectification of the open state in Cx43/Cx45 (A) and Cx32/Cx46 (B) heterotypic junctions, respectively.

GJ channels (26,27). We hypothesized that a difference in unitary conductances of hemichannels affects asymmetry of g_j - V_j plot. We will exploit the model by using voltage ramp protocol to study V_j -gating to validate this statement (see Fig. 10).

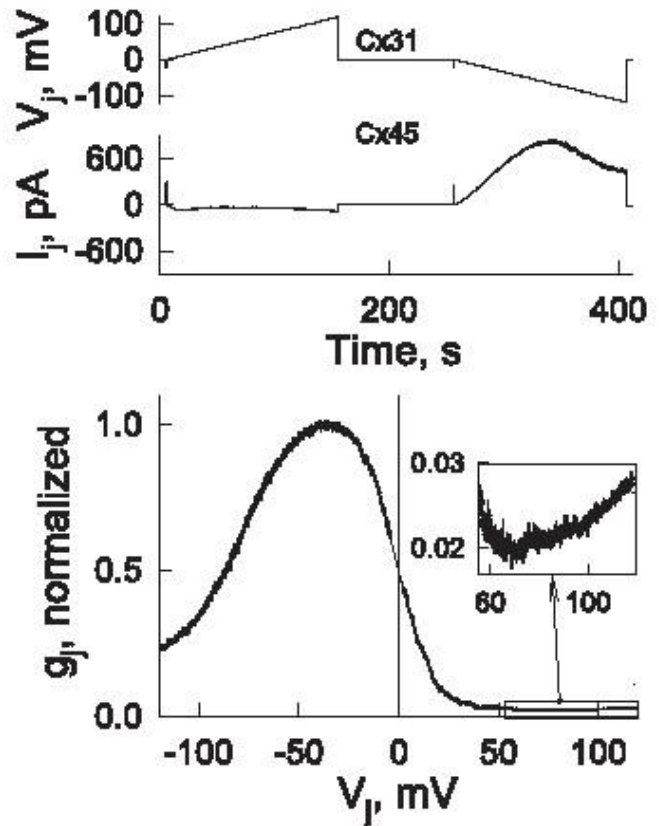


FIGURE 4 V_j -gating in HeLa cell pair forming Cx31-EGFP/Cx45 heterotypic junctions. I_j trace shows strong asymmetry of I_j response to V_j ramps slowly rising from 0 to +115 mV and from 0 to -115 mV. g_j - V_j plot (normalized to maximal g_j at $V_j \approx -40$ mV) shows that at $V_j \approx 0$ only ~50% of Cx31-EGFP/Cx45 channels are open. Data shown in the inset demonstrate an increase of g_j at $V_j > 60$ mV.

The g_{ss} - V_j plot calculated from V_j and I_j traces allows us to suggest that at $V_j \approx 0$ only a fraction ($<1/2$) of Cx31/Cx45 channels are open and g_{ss} increases when the Cx45 side is relatively more positive and decreases almost to zero when the Cx45 side is more negative. Similar g_j - V_j gating asymmetry was documented in other heterotypic junctions, such as Cx43/Cx45 (26) and Cx40/Cx45 (20). Interestingly, the data shown in the inset demonstrate that when V_j increased from 60 to 110 mV, g_{ss} increased. This phenomenon was reproduced in the model by assuming a presence of conductance rectification of the residual state of Cx45 (see Fig. 9 E).

In summary, heterotypic GJs in contrast to homotypic GJs demonstrate asymmetric V_j -gating. V_j -gating of GJ channel depends on intrinsic gating properties of composing hemichannels as well as on the fraction of V_j that drops on each of them. This fraction is $1/2$ for open homotypic GJ channels, and it can be very different for heterotypic GJ channels formed from Cxs that demonstrate different unitary conductances. In addition, data shown in Figs. 2 B and 3 B demonstrate that I_j - V_j relationship of the single channel of open and residual states can rectify. Thus, in the model, we should take

into account Cx-type dependent V_j -gating sensitivity, unitary conductances of open and residual states, as well as their I/V rectification.

Description of the model

Schematics of transitions between states

In the model, we assume that the GJ channel is formed from A and B hemichannels, and each hemichannel contributes one voltage-sensitive gate that closes channels to the residual state, i.e., imitates the fast gating mechanism (12). Therefore, in concert with previous models (13–15), we assume that two voltage gates in series control the gating of GJ channel (Fig. 5 A). The schematic presentation of the four-state model is shown in Fig. 5 B, where K_i ($i = 1, 2, 3, 4$) are equilibrium constants for each of transitions between states. The channel can occupy one of the four possible states: 1), AoBo, both gates are open, 2), AcBo, A gate is closed and gate B is open, 3), AoBc, A gate is open and B gate is closed, and 4), AcBc, both gates are closed.

The equilibrium constants between the states were described as exponential functions that depend on transjunctional voltage across the hemichannels A and B (V_A and V_B ; we assume that transjunctional voltage across the gate and hemichannel is the same):

$$\begin{aligned} K_1 & \frac{1}{4} e^{A_1 \delta A P, V_A \Delta V_{01} P} \\ K_2 & \frac{1}{4} e^{A_2 \delta P, V_B \Delta V_{02} P} \\ K_3 & \frac{1}{4} \quad ; \\ K_4 & \frac{1}{4} e^{A_3 \delta A P, V_A \Delta V_{03} P} \\ & e^{A_4 \delta P, V_B \Delta V_{04} P} \end{aligned} \quad (1)$$

where A_i is the voltage sensitivity coefficient; V_{0i} is the voltage for half-maximal conductance; and P is a gating polarity, which can be positive or negative. Negative and positive signs for V_A and V_B , respectively, indicate that the two gates are oriented as mirror images of each other. Transjunctional voltage across the GJ channel is a sum of V_A and V_B , i.e., $V_j = V_A + V_B$. Closing one hemichannel changes the voltage across the apposing hemichannel, and this will affect

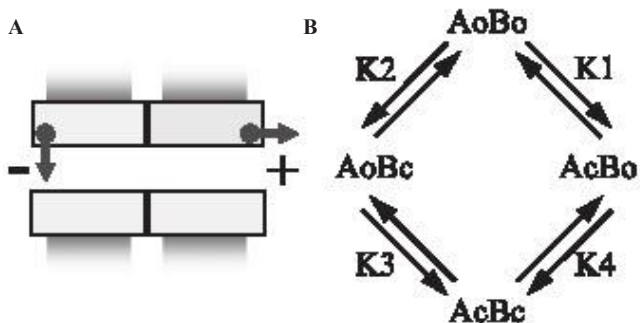


FIGURE 5 Schematics of the four-state model. (A) The scheme of the GJ channel containing the fast gate in each hemichannel. (B) Illustration of a four-state model: 1), AoBo—both gates are open, 2), AcBo—gate A closed and gate B open, 3), AoBc—gate A open and gate B closed, and 4), AcBc—both gates closed. K_i ($i = 1-4$) are equilibrium constants.

the probability of changing the state. Thus, the model exploits principles of contingent gating. Aggregate method was used for a formal description of the model and consequently for writing the algorithm (see Supplement 2 in the Supporting Material). The piece-linear aggregate is described in accordance with Markov principles, i.e., the probability of transitions does not depend on the history of previous transitions. The algorithm was written using C Sharp (C#) programming language.

Assuming that both gates do not interact with each other except via voltage redistribution inside the pore and only voltage across each of A and B hemichannels defines their gating, then $A_1 = A_3$, $A_2 = A_4$, $V_{01} = V_{03}$, and $V_{02} = V_{04}$. As reported earlier (15), regardless of the pathway of transitions between states AoBo and AcBc, thermodynamic law requires that $K_1 = K_4 = K_2 = K_3$. Following the scheme shown in Fig. 5 B, opening and closing probabilities of gate A depend on K_1 : $P(A_{o/c}) = K_1 P(A_{c/o})$. We will define such a small time interval, Dt , at which only one transition for each gate is possible. Interval Dt will be used as a simulation step. For example, when $K_1 = 1$, both open and closed states of the gate are equally possible, $P(A_o) = P(A_c)$. When system is at equilibrium, average number of open and closed gates does not change. Thus, the average number of opening and closing events of the gate must be equal or $P \Delta A_o = P \Delta A_{o/c} = P \Delta A_c = P \Delta A_{c/o}$. If we label P_k as a probability that the gate will change the state during time interval Dt , then $P_k = P \Delta A_o = P \Delta A_{o/c} = P \Delta A_c = P \Delta A_{c/o}$. When both states are equally probable ($K_1 = 1$), then $P(A_o) = P(A_c) = 1/2$ and $P_k = (P(A_{o/c}) + P(A_{c/o}))/2$. The difference, $1 - P_k$, is a probability that the gate will stay in the same state. In general, the model defines at any given time whether individual channels remain in the same state or change the state. In junction composed of thousands of GJ channels any new calculation at the same V_j protocol results to random distribution of open and closed states over time for individual channels while the mean g_j remains the same.

Conductance of hemichannels

The proposed model assumes that each hemichannel can be in the open or the closed states with conductances, $g_{h,o}$ and $g_{h,res}$, respectively. Studies of the single GJ channel formed of various Cx isoforms show that the ratio of g_{res}/g_o is in the range of 0.2–0.25. The ratio, $g_{h,res}/g_{h,o}$, for hemichannels should be different and for homotypic GJs $g_{res}/g_o = 2(g_{h,res}/g_{h,o})/(1 + g_{h,res}/g_{h,o})$. However, this relationship could be more complex if both $g_{h,o}$ and $g_{h,res}$ depend on V_j , i.e., when they demonstrate rectifying properties as it is shown in Figs. 2 B and 3 B. Similar to (14), we used single exponential function to describe $g_{h,o}$ and $g_{h,res}$ dependence on V_j : $g_{h,o} = G_o e^{-\Delta V_j/6_o}$ and $g_{h,res} = G_{res} e^{-\Delta V_j/6_{res}}$, where G_o and G_{res} are unitary conductances of hemichannels at $V_j = 0$ mV, and 6_o and 6_{res} determine rectification constant.

We generated three versions of the model that differ in stimulation protocols: 1), consecutive V_j steps rising in the

amplitude, 2), slowly raising V_j ramps, and 3), series of short negative and positive V_j steps of variable frequency. In Supplement 1 in the Supporting Material, we show examples of the screen captures for each of used protocols (see Fig. S1, Fig. S2, and Fig. S3).

Simulation of homotypic GJ channels

Single-channel gating

Fig. 6 A shows I_j recordings in response to three consecutive V_j steps of $\Delta 20$, $\Delta 60$, and $\Delta 100$ mV. We assumed that the cell

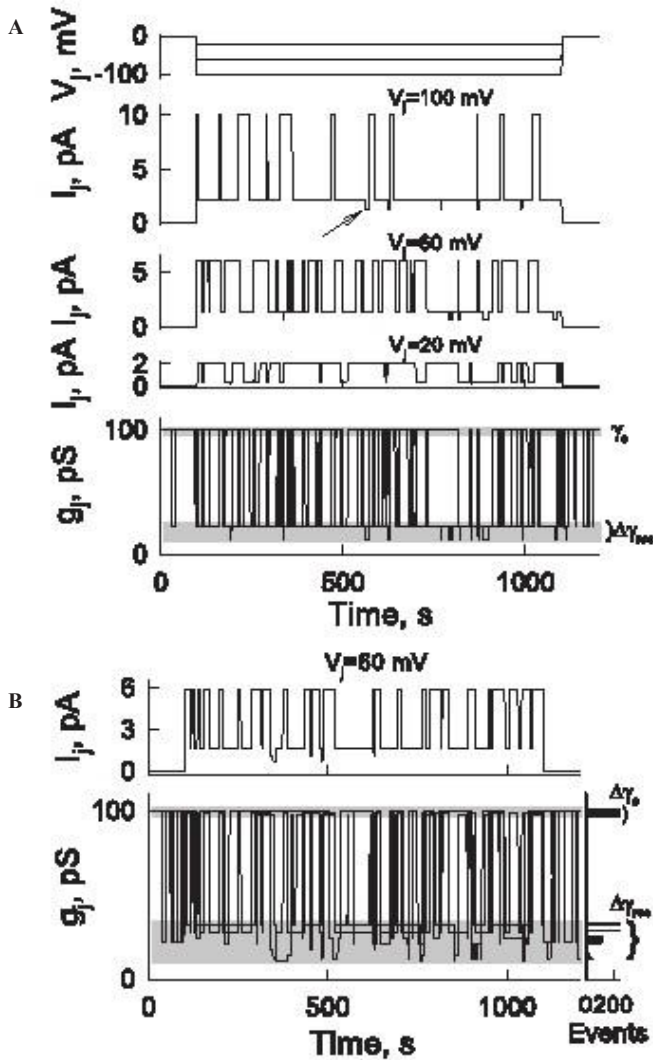


FIGURE 6 Simulation of the junction containing single homotypic GJ channel. The following parameters were identical for both hemichannels: $V_{h,o} \frac{1}{4} 40$ mV, $g_{h,o} \frac{1}{4} 200$ pS, $g_{h,res} \frac{1}{4} 25$ pS, and $A_h \frac{1}{4} 0.05$ mVA $^{-1}$. (A) I_j and g_j traces of nonrectifying channel simulated at three V_j steps of $\Delta 20$, $\Delta 60$, and $\Delta 100$ mV. g_j trace is an overlay of conductances calculated for all three voltage steps. (B) I_j and g_j traces of the channel exhibiting $g_{h,o}$ and $g_{h,res}$ rectification with $g_o \frac{1}{4} 400$ mV and $g_{res} \frac{1}{4} 200$ mV. I_j trace shows single channels gating at $V_j \frac{1}{4} \Delta 60$ mV. The bottom g_j trace shows overlay of conductances at V_j steps of $\Delta 20$, $\Delta 60$, and $\Delta 100$ mV.

pair forms single homotypic GJ channel with parameters identical for both hemichannels: $V_{h,o} \frac{1}{4} 40$ mV $g_{h,o} \frac{1}{4} 200$ pS, $g_{h,res} \frac{1}{4} 25$ pS, $A_h \frac{1}{4} 0.05$ mVA $^{-1}$ ($V_{h,o}$ corresponds to V_{oi} , and A_h corresponds to A_A or A_B in Eq. 1; in homotypic GJ channel $A_A \frac{1}{4} A_B$ and $V_{o,A} \frac{1}{4} V_{o,B}$). In addition, it was assumed that both open and residual states do not rectify, i.e., $g_o \frac{1}{4} N$ and $g_{res} \frac{1}{4} N$. I_j traces show that open channel probability decays with V_j increase, and three conductance states can be distinguished, which are best seen in I_j trace at $V_j \frac{1}{4} 100$ mV. When the channel is fully open, $I_j \frac{1}{4} 10$ pA. When one hemichannel is closed to the residual state ($I_j \frac{1}{4} 2.2$ pA), we call this state as a primary residual state. The arrow shows the substate that we call the secondary residual state when two gates are closed ($I_j \frac{1}{4} 1.3$ pA). An overlay of g_j traces for all three voltage steps show that $g_o \frac{1}{4} 100$ pS, whereas g_{res} is equal 22 pS for the primary residual state and 13 pS for the secondary residual state. When the ratio $g_{h,res}/g_{h,o} \frac{1}{4} 0.125$ (25 pS/200 pS) then for the primary residual state $g_{res}/g_o \frac{1}{4} 0.222$ (22.2 pS/100 pS). Experimental data show that for different connexins g_{res}/g_o is in between 0.2 and 0.25 (12). According to the model, to cover this range of g_{res}/g_o , the ratio, $g_{h,res}/g_{h,o}$, should be in the range of 0.111–0.143, i.e., ~ 2 -fold smaller.

Fig. 6 B shows an example of I_j trace of the single channel at $V_j \frac{1}{4} 60$ mV. All parameters are the same as in Fig. 6 A but the open and residual states exhibit I/V rectification with $g_o \frac{1}{4} 400$ mV and $g_{res} \frac{1}{4} 200$ mV. g_j trace obtained superposing g_j s at three V_j s, as in Fig. 6 A, demonstrates that both g_o and g_{res} are not constant. Next to g_j trace, we show the frequency histogram, which demonstrates that at these particular V_j s three states can be distinguished for g_o and nine states for g_{res} . Repeated simulations, which results in stochastic data sets, show that we are getting 96, 98, and 99 pS for g_o and more substate conductances in the range of 9–25 pS. Therefore, I/V rectification can result to a large variety of g_o and g_{res} measured experimentally at different V_j s.

In summary, for homotypic nonrectifying GJ channel, we can expect having one conductance for g_o and two conductances for g_{res} . The ratio, $g_{h,o}/g_{h,res}$, for hemichannels is approximately twice smaller than ratio, g_o/g_{res} , for GJ channel. If hemichannels exhibit I/V rectification of open and residual states, then in GJ channel both g_o and g_{res} depend on applied V_j s, but g_{res} varies in broader range than g_o .

V_j -gating of homotypic junctions

Fig. 7 shows theoretically predicted G_j (normalized to g_j at $V_j \frac{1}{4} 0$) dependences on V_j . In these calculations, we used identical set of parameters for both hemichannels ($g_{h,o} \frac{1}{4} 200$ pS, $g_{h,res} \frac{1}{4} 25$ pS, $V_{h,o} \frac{1}{4} 40$ mV $A_h \frac{1}{4} 0.1$ mVA $^{-1}$, $g_o \frac{1}{4} N$ and $g_{res} \frac{1}{4} N$) and for each plot only one parameter of six varied. For a clearer description, the hemichannels forming GJ channels were attributed to the left- and right-side hemichannels. In all plots, the same color represents different measured parameters: 1), black lines for G_{in} ; 2), gray lines for G_{ss} ; 3), blue and red lines for the right-side and the left-side hemichannels,

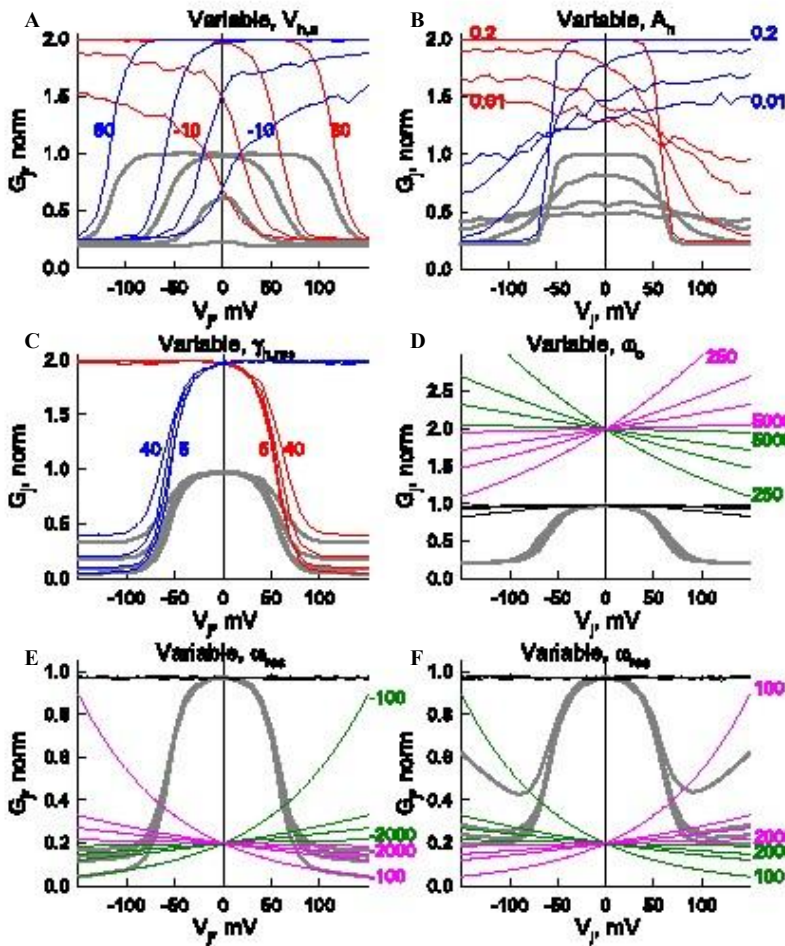


FIGURE 7 Simulated g_j - V_j dependencies of homotypic junctions containing 1000 GJ channels; data were normalized to g values at $V_j \frac{1}{2}$ 0 mV. Identical set of parameters were used for both hemichannels ($g_{h,o} \frac{1}{2}$ 200 pS, $g_{h,res} \frac{1}{2}$ 25 pS, $V_{h,o} \frac{1}{2}$ 40 mV, $A_h \frac{1}{2}$ 0.1 mV A⁻¹, $6_o \frac{1}{2}$ N, and $6_{res} \frac{1}{2}$ N) and in each plot only one parameter of six varied. Measured parameters are shown in different colors: 1), black for G_{in} ; 2), gray for G_{SS} ; 3), blue and red for g of the right-side and the left-side hemichannels, respectively; and 4), pink and green for $g_{h,o}$ and $g_{h,res}$ rectification of the left-side and the right-side hemichannels, respectively. (A) G_{SS} - V_j plots at $V_{h,o}$ of 80, 40, 10, and 10 mV. (B) G_{SS} - V_j plots at A_h of 0.2, 0.05, 0.02, and 0.01 mV A⁻¹. (C) G_{SS} - V_j plots at $g_{h,res}$ of 40, 20, 10, and 5 pS. (D) G_{in} - V_j and G_{SS} - V_j plots at different extent of $g_{h,o}$ rectification, $6_{h,o} \frac{1}{2}$ 5000, 1000, 500, or 250 mV. (E, F) G_{in} - V_j and G_{SS} - V_j plots at different extent of $g_{h,res}$ rectification, $6_{h,res} \frac{1}{2}$ 2000, 500, 300, or 100 mV.

respectively; and 4), pink and green lines for $g_{h,o}$ and $g_{h,res}$ rectification of the left-side and the right-side hemichannels, respectively. In all calculations the number of GJ channels (N) was equal to 1000.

Fig. 7 A demonstrates that when $V_{h,o}$ of left- and right-side hemichannels changed from 80 to 40 mV, there was mainly reduction in the width of G_{SS} - V_j plot but little in g_{max} . Further reduction of $V_{h,o}$ to 10 and 10 mV led to the strong reduction of g_{max} . At $V_{h,o} \frac{1}{2}$ 10 mV GJs almost lost V_j dependence with g_j being close to g_{min} . Supplement 1, Fig. S4, in the Supporting Material demonstrates how G_j - V_j plots shown in Fig. 7 A were acquired.

Fig. 7 B demonstrates that the reduction of A_h from 0.2 to 0.05, 0.02, and 0.01 mV A⁻¹ strongly affected the steepness of G_{SS} decline (DG_{SS}/DV_j) around $V_j \frac{1}{2}$ 40 and 10 mV and reduced g_{max} . At $A_h \frac{1}{2}$ 0.01 mV A⁻¹, G_{SS} shows very weak dependence on V_j .

Fig. 7 C demonstrates that reduction of $g_{h,res}$ from 40 to 20, 10 and 5 pS substantially affected g_{min} but not g_{max} . We did not show simulations with changes of $g_{h,o}$, which always was equal 200 pS, because the character of g_j - V_j plots mainly depends on the ratio, $g_{h,o}/g_{h,res}$, rather than on the absolute values of $g_{h,o}$ and $g_{h,res}$.

Fig. 7 D demonstrates that $g_{h,o}$ rectification at $6_{h,o}$ between 500 and 5000 mV did not visibly affect G_{in} - V_j dependence until $6_{h,o} <$ 300 mV. Therefore, even though $g_{h,o}$ rectifies substantially, it is difficult to detect its effect on G_{in} - V_j plot until this rectification is very significant that may not be physiological. G_{in} - V_j dependence remains the same independent on the direction of $g_{h,o}$ rectification, i.e.,

whether $g_{h,o} \frac{1}{2}$ $e(\Delta V_j/6_o)$ or $g_{h,o} \frac{1}{2}$ $e(V_j/6_o)$. Fig. 7 D shows that $6_{h,o}$ has a relatively small effect of G_{SS} - V_j plot.

Fig. 7, E–F, demonstrate that $g_{h,res}$ rectification had no evident effect on G_{in} but affected most significantly G_{SS} at V_j s exceeding \approx 80 mV, i.e., g_{min} . Rectification of $g_{h,res}$ was changed by attributing to 6_{res} values from 2000 to 100 mV (see pink and green lines). In both plots, $g_{h,res}$ rectifies

but in plot E $g_{h,res} \frac{1}{2}$ $e(\Delta V_j/6_{res})$ and in plot F $g_{h,res} \frac{1}{2}$ $e(V_j/6_{res})$, i.e., $g_{h,res}$ decreased or increased, respectively, with increase of V_j . Plots E and F show that g_{min} tends to continuously decay and increase, respectively, at higher V_j s.

Fig. 8 shows I_j trace that was obtained from simulation of V_j -gating in response to long V_j ramps from 0 to 150 mV and from 0 to 150 mV. We examined how the steepness of V_j ramps affects g_{SS} . We did this experiment by holding the same amplitude of voltage ramps but shortening their

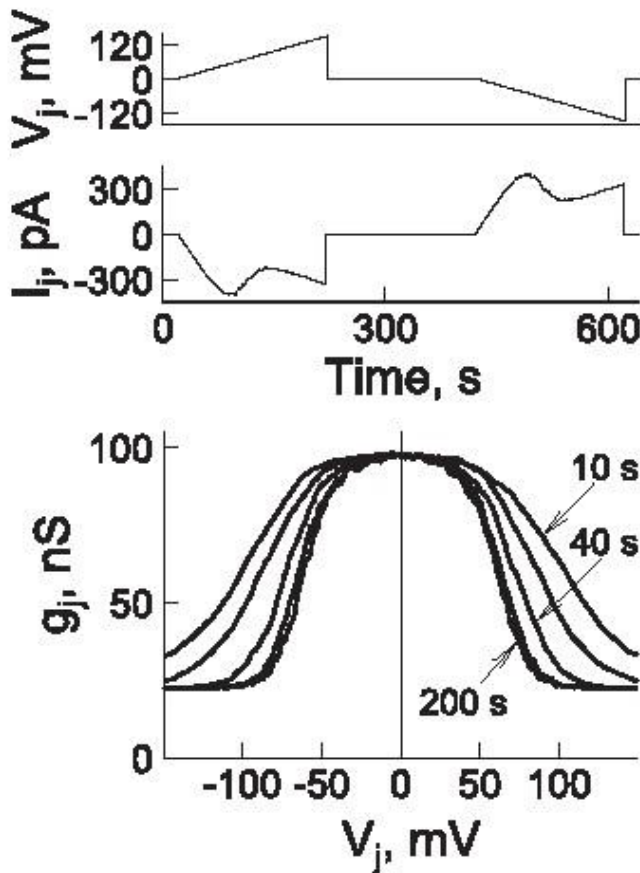


FIGURE 8 Simulation of V_j -gating in homotypic GJs in response to slowly rising V_j ramps from 0 to 150 and from 0 to 150 mV. The slope of ramps was changed by shortening their duration from 200 to 100, 40, 20, and 10 s.

duration stepwise from 200 to 100, 40, 20, and 10 s. At durations of V_j ramps longer than 200 s, g_{ss} - V_j plots practically overlapped (not shown) and were identical to that measured by applying consecutive V_j steps of ~ 30 s or longer. When V_j steps are used, it is possible to visualize whether steps are long enough (T_{min}) to reach the steady state that is not so obvious with the use of V_j ramps. At V_j ramps shorter than 100 s, g_{ss} - V_j plots become broader suggesting that steady state of g_j was not yet reached. Our data show that to reach the steady state, the duration of V_j ramps should be several times longer than T_{min} used for V_j steps. In experimental studies, it is preferable to use slowly raising voltage ramps instead of consecutive V_j steps because it requires less time to measure g_{ss} - V_j plot and it is continuous over entire V_j range. Thus, the model can be used to predict an optimal length of V_j ramps for V_j -gating studies in cells expressing different Cx isoforms.

In summary, data shown in Figs. 7 and 8 demonstrate the influence that each of the independent parameters has on the gating properties of homotypic GJ channels. Shown data demonstrate a consistency independently whether consecutive V_j steps or slow V_j ramps were used to study V_j -gating properties of GJ channels.

V_j -gating of heterotypic junctions

Fig. 9 shows the g_j - V_j plot of a heterotypic junction. In this simulation, we used two sets of parameters (see Fig. 9 A) that are close to those of Cx43 (cell-1) and Cx45 (cell-2). Of all heterotypic junctions, the V_j -gating properties of Cx43/Cx45 junctions are among the most examined (28,26). Fig. 9 B shows the protocol used to simulate g_j - V_j dependence. I_j was calculated in response to consecutive V_j steps increasing stepwise ($\Delta V_j \frac{1}{4} 20$ mV) from 100 to 100 mV. g_j trace shows that during time period from 0 to 30 s ($V_j \frac{1}{4} 0$ mV) g_j decayed from ~ 50 nS reaching the steady state at 39 nS. This decay is caused by the fact that at the starting point we always assumed that GJ channels are fully open and time window of ~ 10 –30 s was used to allow the system to reach the steady state before V_j protocol was applied. g_{ss} - V_j plot (Fig. 9 C; gray line) calculated with the parameters shown in panel A demonstrates a strong V_j -gating asymmetry. The family of g_{ss} - V_j plots show that an asymmetry of V_j -gating increased with the reduction of $V_{h,o}$ of Cx45 from 30 to 10, 10, 30, and 50 mV. We observed similar changes in Cx43/Cx45 GJs during acidification of the cytoplasm (F. F. Bukauskas, unpublished data).

To assess an effect of conductance rectification on V_j -gating, we varied g_o and g_{res} , whereas other parameters remained the same as shown in Fig. 9 A. Fig. 9 D demonstrates that reduction of g_o from 5000 (circles) to 500 (diamonds) and 250 mV (triangles) has small effect on g_{ss} - V_j dependence (gray lines) but increased steepness of g_{in} - V_j plots (black lines). Interestingly, similar changes of g_o did not affect substantially g_{in} of homotypic junctions (see Fig. 7 D). Therefore, an effect of $g_{h,o}$ rectification on g_{in} is obscured in homotypic junctions and is more expressed in heterotypic junctions. Fig. 9 E demonstrate that reduction of g_{res} from 4000 (circles) to 400 (diamonds) and 200 mV (triangles) did not affect g_{in} - V_j dependence (black lines) but modified g_{ss} - V_j plots (gray lines) at higher V_j s. The inset in Fig. 9 E highlights g_{ss} increase with increase of V_j . We observed similar phenomena in Cx45/Cx31 (27), Cx45/Cx40 (20), and Cx45/Cx43 (26) junctions (see also the inset in Fig. 4). Therefore, the model allows us to suggest that this g_{ss} increase may be caused, at least in part, by $g_{h,res}$ rectification.

Previously, V_j -gating asymmetry was commonly used to determine the gating polarity of Cxs composing heterotypic junctions (29,30). This practice was based on an assumption that V_j -gating of heterotypic junctions at different V_j polarities reflects intrinsic gating properties of composing hemichannels. We tested this by superposing simulated g_{ss} - V_j plot of heterotypic junction with those corresponding to homotypic junctions. Gray lines in Fig. 10 A show g_{ss} - V_j plots of Cx43 and Cx45 homotypic junctions with parameters shown in Fig. 9 A. Solid black line 1 shows g_{ss} - V_j plot of heterotypic junction with parameters used for simulation of corresponding homotypic junctions. To examine how the difference in unitary conductances of composing hemichannels affect

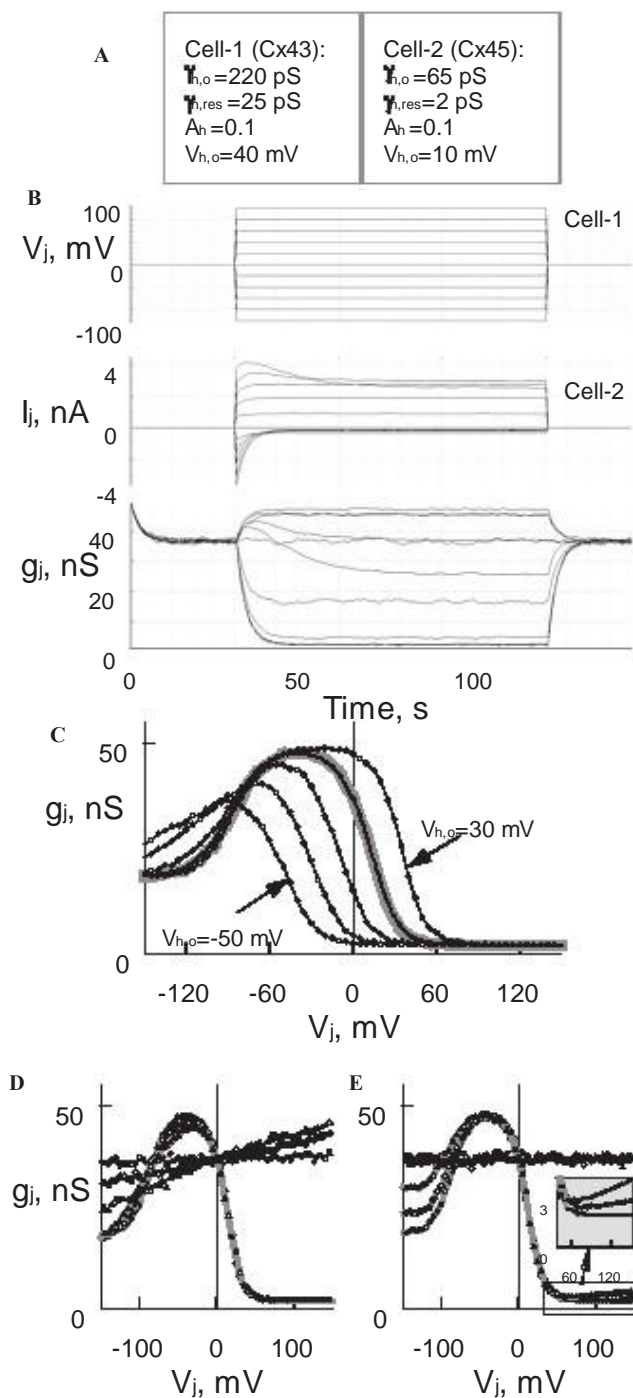


FIGURE 9 G_j - V_j plots of heterotypic junction. Two sets of parameters shown in **A** were used for this simulation. **(B)** I_j and g_j traces were calculated in response to consecutive V_j steps increasing stepwise ($\Delta V_j \frac{1}{4} 20$ mV) from $A100$ to 100 mV. **(C)** The family of g_{ss} - V_j plots show that V_j -gating asymmetry increased with the reduction of $V_{h,o}$ of Cx45 from 30 to 10 (thick gray line), $A10$, $A30$, and $A50$ mV. **(D and E)** An effect of $g_{h,o}$ and $g_{h,res}$ rectification on V_j -gating. g_{ss} - V_j (gray lines) and g_m - V_j (black lines) plots shown in **D** were obtained at $g_{h,o}$ of 5000 (circles), 500 (diamonds), and 250 mV (triangles). g_{ss} - V_j (gray lines) and g_m - V_j (black lines) plots shown in **E** were obtained at $g_{h,res}$ of 4000 (circles), 400 (diamonds), and 200 mV (triangles). The inset in **E** highlights g_{ss} increase with increase of V_j .

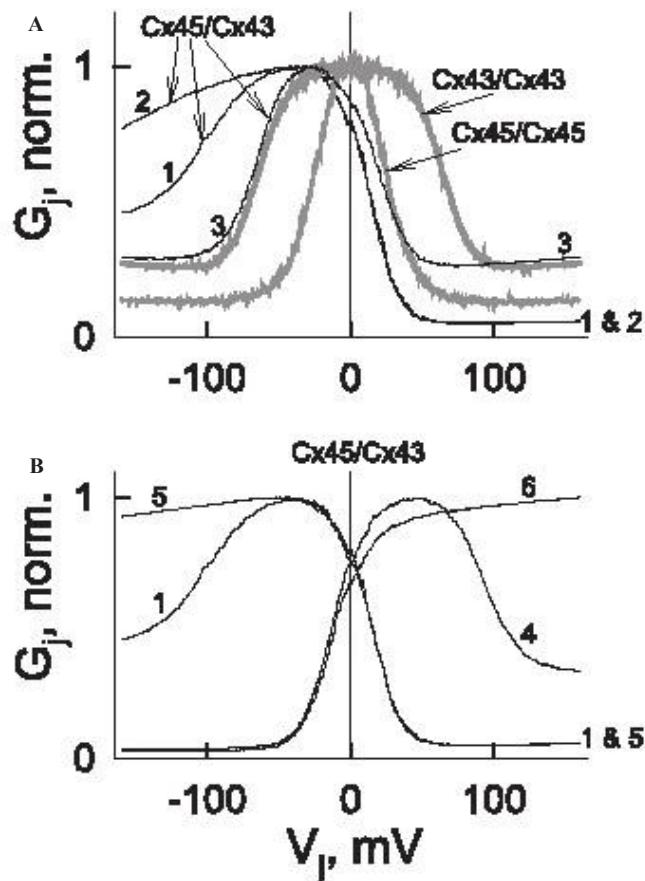


FIGURE 10 Simulation of V_j -gating in heterotypic junctions. **(A)** Shown demonstrates that V_j -gating asymmetry of heterotypic GJs (black lines) depends on the ratio of unitary conductances of composing hemichannels. Gray lines show G_{ss} - V_j plots of presumptive Cx43 and Cx45 homotypic junctions. Solid black lines, 1–3, show g_{ss} - V_j plots at different unitary conductances of composing hemichannels. **(B)** V_j -gating at different gating polarities of composing hemichannels. Plots 1 and 4 were obtained when both gates had the same gating polarity, negative and positive, respectively. Plots 5 and 6 were obtained when both gates had different gating polarities, Cx45 negative and Cx43 positive (5) and Cx45 positive and Cx43 negative (6).

g_{ss} - V_j plot, we changed $g_{h,o}$ and $g_{h,res}$ of Cx45 hemichannel making it twofold smaller than shown in **Fig. 9 A**, i.e., $g_{h,o} \frac{1}{4} 30$ pS and $g_{h,res} \frac{1}{4} 2$ pS (see g_{ss} - V_j plot 2); or equal to Cx43 hemichannel, i.e., $g_{h,o} \frac{1}{4} 220$ pS and $g_{h,res} \frac{1}{4} 25$ pS (see g_{ss} - V_j plot 3). Indeed, when conductances of both hemichannels were equal, then the g_{ss} - V_j dependence of heterotypic junctions best matches the original prediction. However, when $g_{h,o}$ of Cx45 hemichannel becomes increasingly lower than that of the Cx43 hemichannel, then we can see the following tendency: the V_j -gating sensitivity of Cx45 hemichannel increases (the right shoulder of g_j - V_j plot is shifted to the left), whereas V_j -gating sensitivity of Cx43 hemichannel decreases (the left shoulder of g_j - V_j plot also is shifted to the left). This phenomenon was demonstrated earlier (12,20) and was explained by the fact that the difference in unitary conductances of composing hemichannels results to higher

fraction of V_j to drop across the hemichannel with smaller conductance, making this hemichannel virtually more sensitive to V_j . Our model fully supports the proposed mechanism. Therefore, unitary conductances of Cxs should be taken into account when efforts are made to find gating polarity of Cxs from gating profiles of homo- and heterotypic junctions.

All G_j - V_j plots shown in Fig. 10 A were simulated assuming that gating polarity of Cx43 and Cx45 hemichannels is negative as it has been shown experimentally (26). Fig. 10 B demonstrates how changes in gating polarity affect V_j -gating; all other parameters remained the same as shown in Fig. 9 A. Plots 1 and 4 in Fig. 10 B were obtained when both gates had negative and positive gating polarity, respectively. Plots 5 and 6 were obtained when both gates had different gating polarities, Cx45 negative and Cx43 positive (5), and Cx45 positive and Cx43 negative (6). Thus, the model can help to determine whether Cxs composing heterotypic junctions exhibit the same or different gating polarities.

Modulation of electrical signal cell-to-cell transfer asymmetry in heterotypic junctions

Fig. 11 A shows experimental recordings of voltage in HeLaCx45 (V_1) and HeLaCx40-CFP (V_2) forming heterotypic Cx40/Cx45 junctions. Repeated 80 mV voltage steps of positive and negative polarity were applied to cell-1 (V_1) patched in whole-cell voltage clamp configuration and electrotonic response was measured in cell-2 patched in the current-clamp configuration. It is evident that signal transfer can be modulated from virtually unidirectional to bidirectional by increasing the holding potential in the cell expressing Cx45; arrows show moments when the holding potential was

increased stepwise. We have reported similar signaling asymmetry for Cx45/Cx31 (27) and Cx45/Cx43 (26) junctions and proposed that it is due to the V_j -gating asymmetry (12).

Fig. 11 B demonstrates simulation of signal transfer in heterotypic junction formed of Cxs with properties resembling Cx40 or Cx43 (cell-1) and Cx45 (cell-2). Both cells are in the voltage clamp mode. I_j trace shown in Fig. 11 B can be transformed into V_2 trace, similar to the one shown in Fig. 11 A, by multiplying I_j to the constant value of the input resistance of cell-2. The holding potential of cell-2 is always equal 0 mV. Three series of positive and negative pulses of 100 mV in amplitude were applied to cell-1. During the first series, when the holding potential of cell-1 is ± 15 mV, then I_j trace shows substantial signal transfer asymmetry determined as the ratio of I_j s at the end of cycles with negative and positive V_j pulses, which was equal ~ 8.4 . During the second and the third series of stimulation, when the holding potential of cell-1 was 0 mV and ± 15 mV, then signal transfer asymmetry decreased to 2.4 and 1.5, respectively. The bottom trace shows g_j change over time. At the beginnings of each series we assume that all channels are open, allowing the system to equilibrate before V_j steps are applied. This explains why each of three series starts with $g_j \approx 65$ nS. Thus, the model allows us to observe dynamics of g_j at $V_j \approx 0$ mV that is not possible to achieve in the experiment.

DISCUSSION

Our model is based on the V_j -gating concept initially proposed by Harris et al. (13) assuming that each hemichannel of GJ channel contain two oppositely oriented gates, which

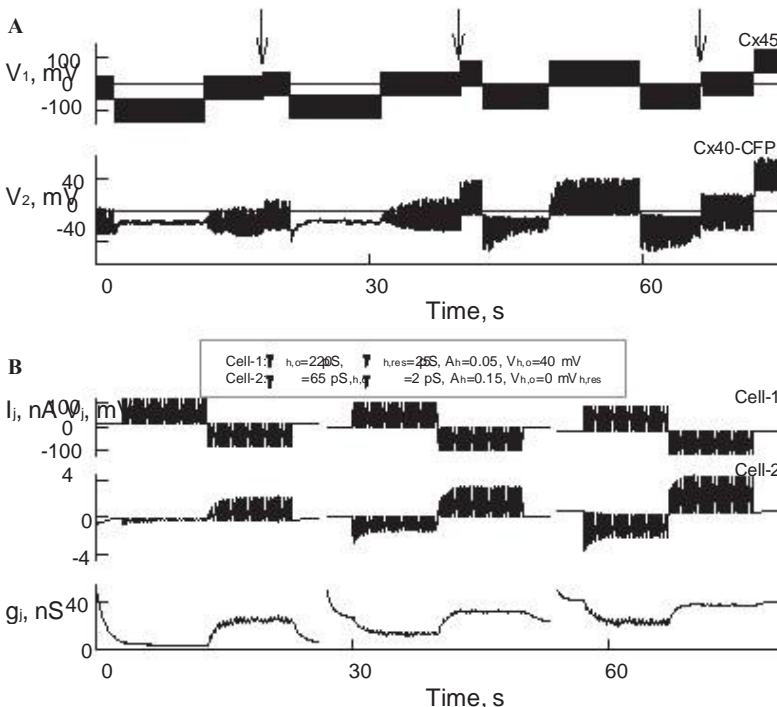


FIGURE 11 Experimental and simulated data demonstrating signal transfer asymmetry in heterotypic junctions. (A) Cell-to-cell transfer of electrical signal is modulated from unidirectional to bidirectional with changes in the holding potential of one of the cells. V_1 and V_2 are experimental traces of voltage recordings in Cx40-CFP/Cx45 junctions. Repeated voltage steps (~ 80 mV) of positive and negative polarity were applied to cell-1 (V_1), which is in whole-cell voltage clamp configuration. V_2 trace shows voltage recordings in cell-2, which is in current-clamp configuration. (B) Simulation of signaling asymmetry in heterotypic junctions. Both cells are in the voltage clamp mode. On top are shown parameters of cell-1 and cell-2 used in this simulation. Three series of positive and negative repeated pulses of 100 mV in amplitude were applied to cell-1. During the first series, when the holding potential of cell-1 is ± 15 mV, I_j trace shows signal transfer asymmetry equal ~ 8.4 , which was determined as the ratio of I_j s at the end of series with negative and positive V_j pulses. During the second and the third periods of simulation, when the holding potential of cell-1 was reduced to 0 mV and ± 15 mV, then signal transfer asymmetry decreased to 2.4 and 1.5, respectively. The holding potential of cell-2 was equal 0 mV.

operate based on contingent gating principles. Voltage gating properties of GJ channels were described using Boltzmann function proposing that GJ channels have two states, open and fully closed, as most of ionic channels. We used stochastic approach to calculate gating properties and assumed that the channel exhibits the residual conductance when V_j -gate is closed. Therefore, closing of the gate should not lead to the drop of entire V_j across a gated hemichannel. In 1993 it was shown, for the first time, that GJ channels in the insect cells during V_j -gating exhibit fast gating transitions between the open state and the substate called as a residual state (8,31). Soon after, V_j -gating to the substates was demonstrated also in mammalian cell lines expressing Cx43 (7), Cx40 (32), and even between cells expressing different Cxs and forming Cx26/Cx32 heterotypic GJs (33). Later, more members of Cx family were cloned and it was shown that g_o can vary from ~ 10 to 300 pS (4). These new data made evident that during V_j gating of heterotypic junctions the single-channel conductance is an important factor, which can define V_j distribution inside the channel pore, i.e., hemichannel with smaller conductance will see across it higher proportion of V_j and experience more extensive gating, whereas voltage gating of hemichannels with larger conductance will be less affected by V_j .

In this model, like in one of Chen-Izu et al. (15), we take into consideration that only the fast gates that close channels to the substate are in operation. Simulation at the single-channel level revealed that nonrectifying homotypic GJ channel has one conductance for g_o (both hemichannels open) and two conductances for g_{res} , whereas rectifying channels are potential to exhibit unlimited number of unitary conductances of g_o and g_{res} . Furthermore, g_{res} varied in much broader range than g_o as it is shown in Fig. 6 B. Thus, these data may explain some discrepancies of single-channel conductance for open and residual states reported by different groups for the same type of Cx isoform. The simulation also revealed that the ratio, $g_{h,res}/g_{h,o}$, for the hemichannel is approximately twice smaller than a corresponding ratio, g_{res}/g_o , for GJ channel, which is $\sim 1/4$ – $1/5$. This suggests that at the residual state the channel pore is closed at higher degree than could be predicted from the ratio, g_{res}/g_o . For example, if $g_{h,res}/g_{h,o} \sim 1/10$, then we can presume that only $\sim 1/10$ of cross-section of the hemichannel pore is open; assuming that the gate closes the hemichannel pore uniformly along its length. If the gate occupies only the small fraction of the pore then, to maintain the same ratio, narrowing of the pore during gating could be even bigger. This may create significant size-limited restrictions for macromolecules to permeate the channel gated to the residual state and explain no permeability of the residual state to dyes that permeate the open state (34,22). Otherwise, it could be assumed that permeability for dye molecules should be reduced proportionally with the ratio, g_{res}/g_o .

Data shown in Fig. 7 demonstrate the influence of each of independent parameters of the model on the V_j -gating prop-

erties of GJ channels. When $V_{h,o}$ changed from 80 to ~ 30 mV that is equivalent to the shift of g_h - V_j curve along the V_j axis, this reduced g_{max} and the width of the bell shaped g_{ss} - V_j plot. The reduction of A_h from 0.2 to 0.01 mV Δ strongly affected the maximal steepness of g_{ss} decline (Dg_{ss}/DV_j) and reduced g_{min} . The reduction of $g_{h,res}$ from 40 to 5 pS affected mainly g_{min} . Simulation showed that $g_{h,o}$ rectification minimally affected g_{in} in homotypic GJs. With V_j increase, $g_{h,o,L}$ of left-side hemichannel increases and $g_{h,o,R}$ of right-side hemichannels decreases (see Fig. 7 D) resulting to small or no change of g_{in} over V_j . Therefore, it is problematic detecting $g_{h,o}$ rectification from g_{in} - V_j plots of homotypic junctions. Otherwise, in heterotypic junctions, hemichannel with lower conductance dominates in defining g_{in} and GJ channel can exhibit well expressed g_o rectification if $g_{h,o}$ rectifies (see Fig. 9 D). These conclusions are in full concert with earlier modeling studies (14). There are several reports demonstrating g_o or g_{in} rectification of heterotypic GJ channels (35,33,36,37), and one example is shown in Fig. 3 B. $g_{h,res}$ rectification had no evident effect on g_{in} but affected most significantly g_{ss} at higher V_j s (see Fig. 7, E–F).

Though most of data shown in Fig. 7 could be intuitively predicted, some of them were unanticipated to us. For example, V_j -gating weakens or virtually disappears at $V_{h,os}$ below 30 mV (see Fig. 7 A) or at A_h s below ~ 0.02 (see Fig. 7 B). This may explain some of our unexpected observations when during partial recovery from uncoupling by CO₂, arachidonic acid or other uncouplers, we observed g_j recovery but with strongly reduced V_j -gating. Another informative conclusion comes from Fig. 7 A. At $V_{h,os}$ close to 0 mV, g_{max} is $\sim 1/2$ of that if all channels would be open. Thus, at $V_j \sim 0$ mV, only a fraction of channels are open. This phenomenon is also well illustrated in Fig. 10 A demonstrating V_j -gating of heterotypic junctions. g_j increased $\sim 25\%$ by changing V_j from 0 to ~ 30 mV also suggesting that only a fraction of channels were open at $V_j \sim 0$ mV. Experiments with Cx45 homotypic GJs revealed that at $V_j \sim 0$ mV only $\sim 50\%$ of channels are closed due to the open channel probability being much below 1 (26). More recent data show that other Cxs, such as Cx45, Cx46, or Cx57, show similar properties (F. F. Bukauskas, unpublished data). For this reason, differently from earlier models of V_j -gating, we used a lag time allowing channels to equilibrate to the steady state (see g_j traces in Figs. 9 B and 11 B). We suppose that would be incorrect to apply V_j protocol without reaching a steady state at $V_j \sim 0$ mV, and even more for Cxs exhibiting high V_j -gating sensitivity, such as Cx37, Cx45, or Cx57.

For the simulation of a heterotypic junctions, we used two sets of parameters that are close to those of Cx43 (cell-1) and Cx45 (cell-2). Most of heterotypic junctions demonstrate a strong V_j -gating asymmetry illustrated in Figs. 4 and 9. In all examined heterotypic junctions that contain on one side Cx45, such as Cx31/Cx45, Cx40/Cx45, Cx43/Cx45 ((27); reviewed in (12)), or Cx36/Cx45 and Cx47/Cx45 (F. F. Bukauskas, unpublished data), we observed cell-to-cell electrical signal

transfer asymmetry that can be modulated from virtually unidirectional to bidirectional by changing the difference in holding potentials (DV_h) between coupled cells as illustrated in Fig. 11 A. Simulation data shown in Fig. 11 B confirm that V_j -gating asymmetry is one of the key factors defining such signaling asymmetry and that it can be effectively modulated by DV_h .

Previously, V_j -gating asymmetry of heterotypic junctions was commonly used to determine the gating polarity of Cxs assuming that V_j -gating of heterotypic junctions is a derivative of intrinsic gating properties of composing hemichannels. Our data show that this may be true only if the conductance of composing hemichannels is equal. When $g_{h,o}$ of one hemichannel becomes increasingly lower than $g_{h,o}$ of other hemichannel, then V_j -gating sensitivity of the first hemichannel increases whereas V_j -gating of the second hemichannel decreases (see Fig. 10 A). This phenomenon was demonstrated earlier (12,20) and was explained by the fact that the difference in unitary conductances of composing hemichannels results to higher fraction of V_j to drop across the hemichannel with smaller conductance, making this hemichannel virtually more sensitive to V_j . Thus, the contingent gating model in broad interpretation assumes that hemichannel with smaller conductance will see across it higher proportion of V_j and experience more extensive gating, whereas voltage gating of hemichannels with larger conductance will be less affected by V_j . Fitting of the experimental data to the model allows to estimate parameters defining V_j -gating sensitivity of composing hemichannels ($V_{h,o}$ and A_h) as well as their gating polarities from experimentally defined g_i - V_j dependence. It was proposed that the gating polarity of the fast gating mechanism is governed by charged residues in the N-terminal domain (30,38), and that this polarity could be reversed independent from the slow gating mechanism (23). Modifications of Cx43, including deletion of the carbocyl-terminus (CT) domain (39) or attachment of aequorin or an enhanced green fluorescent protein (EGFP) to CT, selectively abolishes fast gating to the residual state (40,17). Therefore, the location of the fast gate remains to be determined, and in this process, knowledge of the gating polarity of each Cx isoform is essential.

Presented data demonstrate that the model helps to find more details about the gating process and extrapolate gating properties of hemichannels composing GJ from experimentally defined g_{in} - V_j and g_{ss} - V_j plots. In addition, the model allows seeing dynamics of g_i during time periods when $V_j \neq 0$. This is highly supportive information in defining g_i dynamics before V_j s protocol is applied or after g_i recovery to the steady state after V_j -gating. Experiments do not allow doing so without applying V_j . Significant improvement of this model relies on its ability to describe the kinetic behavior of channels, to simulate V_j -gating properties at the single-channel level or having unlimited number of channel in the junctions. The model also provides a practical formalism for fitting the voltage-gating profile over the entire voltage range, elimi-

nating the previous need for data splicing for different V_j polarities. The proposed model also applies relatively easily to study V_j -gating of hemichannels simply by increasing $g_{h,o}$ and $V_{h,o}$ of one of composing hemichannels to infinity. Furthermore, assuming that each hemichannel in this model corresponds to the half of unapposed hemichannel, and that one gates imitates the fast gate that closes to the residual state whereas the second gate imitates the slow gate that closes to the fully closed state ($g_{h,res} \approx 0$), then the model can be used to simulate gating of unapposed hemichannels containing both fast and slow gating mechanisms. Thus, this model presents a useful tool for quantitative characterization of V_j -gating in GJ channels and unapposed hemichannels.

Limitations of the model and future directions

Although our model takes into consideration many of GJ channel properties, such as $g_{h,o}$, $g_{h,res}$, $V_{h,o}$, A_h , conductance rectification and gating polarity, still there is room for its improvement. This model applies to channels exhibiting one substate called as the residual conductance but not to channels exhibiting multiple substates. One of the ways to do so would be to introduce the gate that is composed of six subunits (each hemichannel is a hexamer of connexins) similar to that proposed earlier (41). It remains unclear whether there is a cooperative interaction between gating subunits and whether it depends on V_j .

The proposed model was adapted to cells that form one type of GJ channels. The model can be expanded to junctions that have in parallel several types of homotypic and/or heterotypic GJ channels. In parallel, introducing a slow gating mechanism in addition to the fast gate would be one of major steps for improvement. We are in the process of introducing such a model. When each hemichannel contain two gates instead of one, the calculation time is in the range of tens of minutes instead of seconds (this time also depends on number of channels and V_j protocol; see Fig. S1, Fig. S2, and Fig. S3 in Supplement 1). In addition, there are several problems that need to be solved. The location of the fast and slow gates, their interaction, and what fraction of V_j drops on each of them remains unclear. These questions can be at least partially solved by fitting a variety of experimental data with different versions of the model.

SUPPORTING MATERIAL

Three supplements, five figures, and two references are available at [http://www.biophysj.org/biophysj/supplemental/S0006-3495\(09\)00666-3](http://www.biophysj.org/biophysj/supplemental/S0006-3495(09)00666-3).

This work was supported by National Institutes of Health grants R01 NS036706 and R01HL084464 (to F.F.B.).

REFERENCES

- Lo, C. W. 2000. Role of gap junctions in cardiac conduction and development: insights from the connexin knockout mice. *Circ. Res.* 87:346–348.

2. Dermietzel, R., M. Kremer, G. Paputsoglu, A. Stang, I. M. Skerrett, et al. 2000. Molecular and functional diversity of neural connexins in the retina. *J. Neurosci.* 20:8331–8343.
3. Sohl, G., S. Maxeiner, and K. Willecke. 2005. Expression and functions of neuronal gap junctions. *Nat. Rev. Neurosci.* 6:191–200.
4. Kreuzberg, M. M., K. Willecke, and F. Bukauskas. 2006. Connexin-mediated cardiac impulse propagation: connexin 30.2 slows atrioventricular conduction in mouse heart. *Trends Cardiovasc. Med.* 16:266–272.
5. Spray, D. C., A. L. Harris, and M. V. Bennett. 1981. Gap junctional conductance is a simple and sensitive function of intracellular pH. *Science.* 211:712–715.
6. Bennett, M. V., and V. K. Verselis. 1992. Biophysics of gap junctions. *Semin. Cell Biol.* 3:29–47.
7. Moreno, A. P., M. B. Rook, G. I. Fishman, and D. C. Spray. 1994. Gap junction channels: distinct voltage-sensitive and -insensitive conductance states. *Biophys. J.* 67:113–119.
8. Weingart, R., and F. F. Bukauskas. 1993. Gap junction channels of insects exhibit a residual conductance. *Pflugers Arch.* 424:192–194.
9. Spray, D. C., A. L. Harris, and M. V. Bennett. 1981. Equilibrium properties of a voltage-dependent junctional conductance. *J. Gen. Physiol.* 77:77–93.
10. Bukauskas, F. F., and C. Peracchia. 1997. Two distinct gating mechanisms in gap junction channels: CO₂-sensitive and voltage-sensitive. *Biophys. J.* 72:2137–2142.
11. Banach, K., and R. Weingart. 2000. Voltage gating of Cx43 gap junction channels involves fast and slow current transitions. *Pflugers Arch.* 439:248–250.
12. Bukauskas, F. F., and V. K. Verselis. 2004. Gap junction channel gating. *Biochim. Biophys. Acta.* 1662:42–60.
13. Harris, A. L., D. C. Spray, and M. V. L. Bennett. 1981. Kinetic properties of a voltage-dependent junctional conductance. *J. Gen. Physiol.* 77:95–117.
14. Vogel, R., and R. Weingart. 1998. Mathematical model of vertebrate gap junctions derived from electrical measurements on homotypic and heterotypic channels. *J. Physiol.* 510:177–189.
15. Chen-lzu, Y., A. P. Moreno, and R. A. Spangler. 2001. Opposing gates model for voltage gating of gap junction channels. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 281:C1604–C1613.
16. Ramanan, S. V., P. R. Brink, K. Varadaraj, E. Peterson, K. Schirrmacher, et al. 1999. A three-state model for connexin37 gating kinetics. *Biophys. J.* 76:2520–2529.
17. Bukauskas, F. F., K. Jordan, A. Bukauskiene, M. V. Bennett, P. D. Lampe, et al. 2000. Clustering of connexin 43-enhanced green fluorescent protein gap junction channels and functional coupling in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:2556–2561.
18. Kreuzberg, M. M., G. Sohl, J. Kim, V. K. Verselis, K. Willecke, et al. 2005. Functional properties of mouse connexin30.2 expressed in the conduction system of the heart. *Circ. Res.* 96:1169–1177.
19. Teubner, B., J. Degen, G. Sohl, M. Guldenagel, F. F. Bukauskas, et al. 2000. Functional expression of the murine connexin 36 gene coding for a neuron-specific gap junctional protein. *J. Membr. Biol.* 176:249–262.
20. Rackauskas, M., M. M. Kreuzberg, M. Pranevicius, K. Willecke, V. K. Verselis, et al. 2007. Gating properties of heterotypic gap junction channels formed of connexins 40, 43 and 45. *Biophys. J.* 92:1952–1965.
21. Trexler, E. B., F. F. Bukauskas, M. V. L. Bennett, T. A. Bargiello, and V. K. Verselis. 1999. Rapid and direct effects of pH on connexins revealed by the connexin46 hemichannel preparation. *J. Gen. Physiol.* 113:721–742.
22. Bukauskas, F. F., A. Bukauskiene, and V. K. Verselis. 2002. Conductance and permeability of the residual state of connexin43 gap junction channels. *J. Gen. Physiol.* 119:171–186.
23. Oh, S., C. K. Abrams, V. K. Verselis, and T. A. Bargiello. 2000. Stoichiometry of transjunctional voltage-gating polarity reversal by a negative charge substitution in the amino terminus of a connexin32 chimera. *J. Gen. Physiol.* 116:13–31.
24. Trexler, E. B., F. F. Bukauskas, J. Kronengold, T. A. Bargiello, and V. K. Verselis. 2000. The first extracellular loop domain is a major determinant of charge selectivity in connexin46 channels. *Biophys. J.* 79:3036–3051.
25. Valiunas, V., and R. Weingart. 2000. Electrical properties of gap junction hemichannels identified in transfected HeLa cells. *Pflugers Arch.* 440:366–379.
26. Bukauskas, F. F., A. Bukauskiene, V. K. Verselis, and M. V. L. Bennett. 2002. Coupling asymmetry of heterotypic connexin 45/connexin 43-EGFP gap junctions: properties of fast and slow gating mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:7113–7118.
27. Abrams, C. K., M. M. Freidin, V. K. Verselis, T. A. Bargiello, D. P. Kelsell, et al. 2006. Properties of human connexin 31, which is implicated in hereditary dermatological disease and deafness. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103:5213–5218.
28. Moreno, A. P., G. I. Fishman, E. C. Beyer, and D. C. Spray. 1995. Voltage dependent gating and single channel analysis of heterotypic gap junction channels formed of Cx45 and Cx43. In *Intercellular Communication through Gap Junctions*, Progress in Cell Research. Y. Kanno, K. Kataoka, Y. Shiba, and Y. Shibata, editors. Elsevier Science Publishers, B.V., Amsterdam, The Netherlands. 405–408.
29. Bruzzone, R., J. A. Haefliger, R. L. Gimlich, and D. L. Paul. 1993. Connexin40, a component of gap junctions in vascular endothelium, is restricted in its ability to interact with other connexins. *Mol. Biol. Cell.* 4:7–20.
30. Verselis, V. K., C. S. Ginter, and T. A. Bargiello. 1994. Opposite voltage gating polarities of two closely related connexins. *Nature.* 368:348–351.
31. Bukauskas, F. F., and R. Weingart. 1993. Multiple conductance states of newly formed single gap junction channels between insect cells. *Pflugers Arch.* 423:152–154.
32. Bukauskas, F. F., C. Elfgang, K. Willecke, and R. Weingart. 1995. Biophysical properties of gap junction channels formed by mouse connexin40 in induced pairs of transfected human HeLa cells. *Biophys. J.* 68:2289–2298.
33. Bukauskas, F. F., C. Elfgang, K. Willecke, and R. Weingart. 1995. Heterotypic gap junction channels (connexin26-connexin32) violate the paradigm of unitary conductance. *Pflugers Arch.* 429:870–872.
34. Qu, Y., and G. Dahl. 2002. Function of the voltage gate of gap junction channels: selective exclusion of molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:697–702.
35. Rubin, J. B., V. K. Verselis, M. V. Bennett, and T. A. Bargiello. 1992. Molecular analysis of voltage dependence of heterotypic gap junctions formed by connexins 26 and 32. *Biophys. J.* 62:183–193.
36. Oh, S., J. B. Rubin, M. V. Bennett, V. K. Verselis, and T. A. Bargiello. 1999. Molecular determinants of electrical rectification of single channel conductance in gap junctions formed by connexins 26 and 32. *J. Gen. Physiol.* 114:339–364.
37. Hopperstad, M. G., M. Srinivas, and D. C. Spray. 2000. Properties of gap junction channels formed by Cx46 alone and in combination with Cx50. *Biophys. J.* 79:1954–1966.
38. Ri, Y., J. A. Ballesteros, C. K. Abrams, S. Oh, V. K. Verselis, et al. 1999. The role of a conserved proline residue in mediating conformational changes associated with voltage gating of Cx32 gap junctions. *Biophys. J.* 76:2887–2898.
39. Elenes, S., A. D. Martinez, M. Delmar, E. C. Beyer, and A. P. Moreno. 2001. Heterotypic docking of Cx43 and Cx45 connexons blocks fast voltage gating of Cx43. *Biophys. J.* 81:1406–1418.
40. Martin, P. E., C. H. George, C. Castro, J. M. Kendall, J. Capel, et al. 1998. Assembly of chimeric connexin-aequorin proteins into functional gap junction channels. Reporting intracellular and plasma membrane calcium environments. *J. Biol. Chem.* 273:1719–1726.
41. Vogel, R., V. Valiunas, and R. Weingart. 2006. Subconductance states of Cx30 gap junction channels: data from transfected HeLa cells versus data from a mathematical model. *Biophys. J.* 91:2337–2348.

IMITACINIS TARPLĄSTELINIŲ PLYŠINIŲ JUNGČIŲ VARTŲ MODELIAVIMAS

Mindaugas Pranevičius* Feliksas Bukauskas, Henrikas Pranevičius***, Nerijus Paulauskas*****

**Department of Anesthesiology, Albert Einstein College of Medicine, Bronx NY*

***Department of Neuroscience, Albert Einstein College of Medicine, Bronx NY*

****Kauno Technologijos Universitetas, Verslo informatikos katedra*

Mes sukūrėme imitacinį tarpląstelinių plyšinių jungčių (PJ) modelį. Modelis pagrįstas Chen-Izu ir kt., aprašymu [6], bet naudoja imitaciją ir aprašo vartų sąveiką persiskirstant įtampos kritimui PJ. Modeliavimo rezultatai atkartojė eksperimentine stacionariu PJ-ies laidumo priklausomybę nuo tarpląstelinio potencialo $G_j(V_j)$. HeLa ląstelėse ekspresuojančiuose koneksiną 31 ir 45. Šis modelis gali nusakyti heterotipinių kanalų vartų savybes pagal atitinkamų homotipinių kanalų charakteristikas.

1. ĮVADAS

Koneksinai (Cx)- tai baltymai, kurie formuoja plyšines tarpląstelines jungtis (PJ) kontakte tarp kaimyninių ląstelių membranų. Plyšinės jungtys leidžia sujungtoms ląstelėms perduoti elektrinius ir metabolinius signalus [1,2]. Kiekvienas PJ kanalas sudarytas iš dviejų puskanalių (koneksonų), kurie savo ruožtu yra sudaryti iš šešių Cx subvienetų. Iki šiol yra klonuota 21 skirtingų žmogaus Cx izoformų [3]. Tarpląstelinėje sąveikoje dalyvaujančios plyšinės jungtys gali būti homotipinės (ląstelės išreiškia tą patį Cx izotipą), heterotipiniai (ląstelės išreiškia skirtingus Cx izotipus) ir heteromeriniai (bent viena ląstelė išreiškia 2 ar daugiau Cx izotipų). PJ kanalai skiriasi elektriniu laidumu, selektyviu pralaidumu įvairioms cheminėms medžiagoms ir kanalų vartų jautrumu įtampai [2].

Koneksinai vadinami tapačiais, jeigu jie gali sudaryti funkcinis heterotipinius PJ kanalus. Dauguma Cx porų gali sudaryti funkcines PJ, bet egzistuoja kai kurios išimtys. Pavyzdžiui: du pagrindiniai širdies koneksinai, Cx40 ir Cx43, kurie yra ekspresuoti širdyje ir kraujagyslėse, nėra tapatūs ir negali sudaryti funkcinų PJ kanalų [4].

Bendra PJ savybė būdinga visiems Cx izotipams yra kanalo vartų būsenos priklausomybė nuo įtampos. Jungties laidumas mažėja sudarius tarpląstelinės jungties potencialą, V_j . Manoma, kad kiekvienas puskanalis turi du skirtingus vartų valdymo mechanizmus: 1) 'lėtas', kuris uždaro PJ pilnai, ir 2) 'greitas', kuris perveda vartus į pereinamą būseną ar būsenas su liekamuoju laidumu [5]. Šiame modelyje mes nagrinėjome tikrai 'greitus' vartus. Mes skaitėme, kad kiekvienas puskanalis gali būti dviejose būsenose: atviroje su laidumu G_o ir uždarytoje su laidumu G_c . Vartų valdymo mechanizmai gali skirtis poliariškumu, tai yra vartai gali užsidaryti arba atsідaryti, jeigu

citoplazmos pusėje potencialas didėja arba mažėja. Jeigu abiejų puskanalių vartai turi ta pati poliariškumą, tai su kiekvienu V_j nelygiu 0 vienas puskanalis atsidaro, o kitas užsidaro. Jeigu puskanalių vartai turi priešingą poliariškumą, vienas V_j poliariškumas atidarys abu puskanalius, o priešingas V_j potencialas uždarys abu puskanalius.

Homotipinės PJ stacionarinės būsenos G_j/V_j priklausomybė yra simetriška $V_j=0$ mV atžvilgiu (Pav. 1). Heterotipinės plyšinės jungtys turi asimetrinę G_j/V_j priklausomybę dėl skirtingo vartų jautrumo įtampai ir skirtingų G_o ir G_c .

2. NUOSEKLUS VARTŲ MODELIS VARTŲ REGULIAVIMUI PLYŠINĖSE TARPLAŠTELINĖSE JUNGTYSE

Mes naudojome modifikuota PJ modeli aprašyta [6] straipsnyje. Vartų reguliavimą nuo V_j mes pakeitėme taip, kad kiekvieno puskanalio vartų būseną apspręstų ne visa V_j , bet tik ta jos dalis, kuri krenta ant kiekvieno iš jų, t.y., V_A ir V_B , kur $V_A+V_B=V_j$.

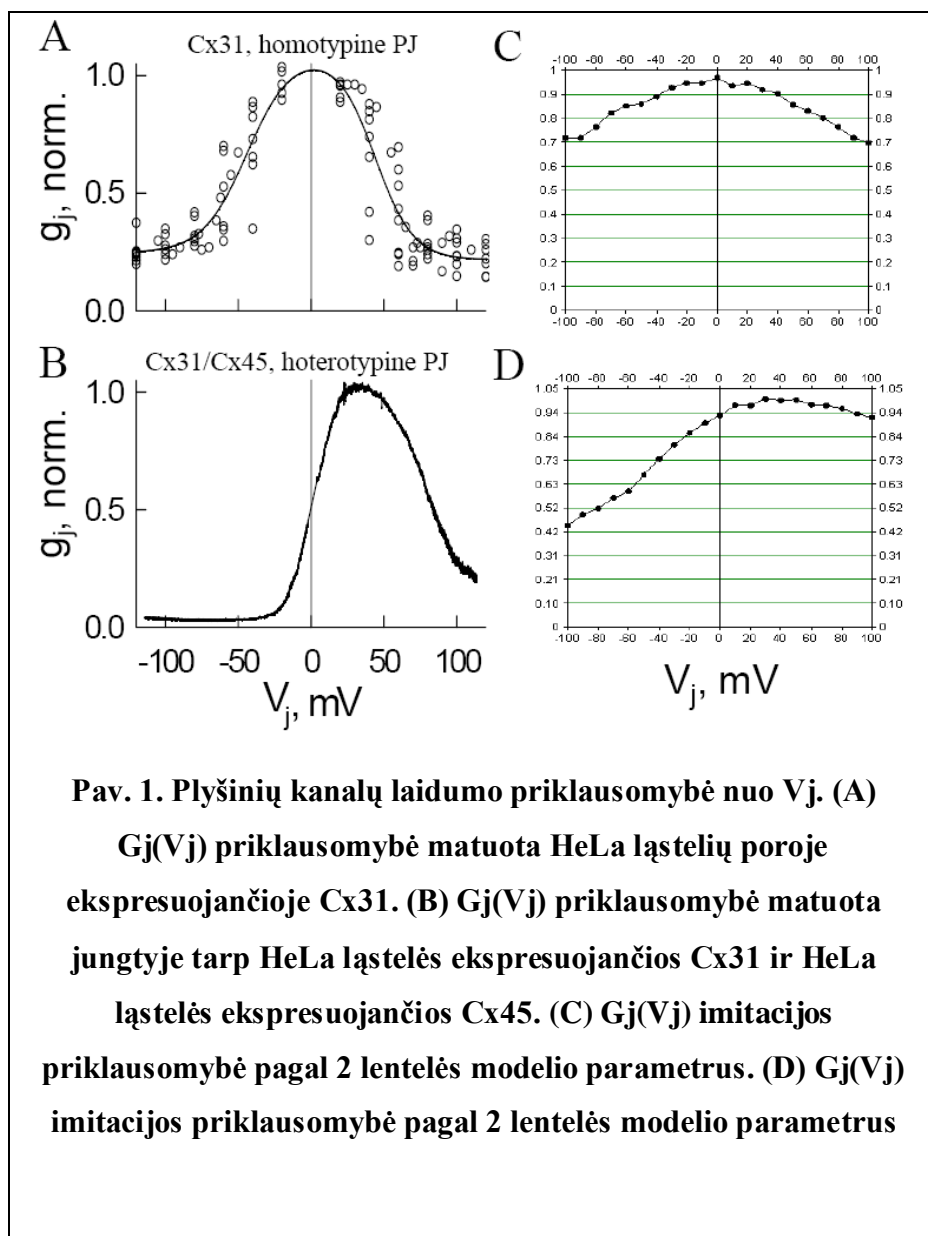
Vartų sąveika dėl įtampos persiskirstymo kanale yra bendresnis sąveikos variantas nei aprašytas Chen-Izu ir kt. [6], kuriame kiekvieno puskanalio vartų valdymas yra nepriklausomas arba determinuotas. Nepriklausomo valdymo (*independent gating*) atveju skaitoma, kad abu puskanaliai valdomi nepriklausomai ir valdanti įtampa yra lygi $1/2 \cdot V_j$. Determinuoto valdymo atveju (*contingency gating*) skaitoma, kad vienam puskanaliui užsidarius visa įtampa krenta per jį, o kitas puskanalis atsidaro. Pvz., jei pirmas puskanalis užsidaro, $V_A=V_j$, o $V_B=0$. Toks supaprastinimas leidžia atkartoti eksperimentinius rezultatus, bet apriboja puskanalių sąveikos analizės galimybes. Imitacinis modeliavimas leidžia analizuoti kanalu sąveiką su skirtingomis G_o , G_c ir vartų įtampos valdymo charakteristikomis.

Mūsų modelyje vartų valdymas apspręstas ne viso V_j , bet V_A ir V_B . V_A ir V_B priklauso nuo V_j bei puskanalių laidumų santykio, kuris savo ruožtu priklauso nuo vartų būsenos (oo, oc, co, cc).

Elektrinės tarpląstelinių plyšinių jungčių savybės dažnai aprašomos normalizuota $G_j(V_j)$ priklausomybe stacionarinėje būsenoje (Pav. 1, A, B).

Mes naudojome šį modelį, kad palyginti vartų jautrumą nuo V_j su eksperimentiniais duomenimis, kur $G_j(V_j)$ charakteristikos buvo matuotos homo ir heterotipinėse plyšinėse jungtyse tarp HeLa ląstelių ekspresuojančių Cx31 ir Cx45.

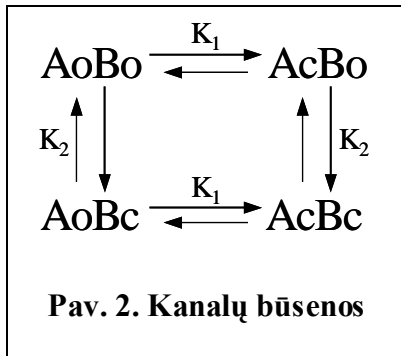
Mes tikrinome hipotezę teigiančią, jog homotipinės jungties modelyje aproksimuoti parametrai gali nusakyti heterotipinės jungties $G_j(V_j)$ priklausomybę.



3. MODELIO APRAŠYMAS

Pav. 2 yra pavaizduotas kanalų būsenų modelis, kuriame kiekvienas kanalas sudarytas iš dviejų nepriklausomų puskanalių, A ir B. Kiekvienas jų funkcionuoja nepriklausomai ir gali būti dviejose būsenose: atidarytoje (o, open) arba uždaroje (c, closed).

Jungtis sudaryta iš $N \gg 1$ kanalų. Per vieną modeliavimo žingsnį (sąlyginai prilyginam 1 ms) kiekvienas puskanalis gali nepriklausomai pereiti iš atviros į uždarytą būseną su tikimybėmis $P(A_{o \rightarrow c})$ ir $P(B_{o \rightarrow c})$. $P(A_{c \rightarrow o})$ ir $P(B_{c \rightarrow o})$ yra perėjimo tikimybės iš uždaros į atvirą būseną.



Modelio parametrai

V_{max} – Įtampos maksimumas

V_{min} – Įtampos minimumas

ΔV_{step} – Įtampos kitimo žingsnis

T_0 – Nusistovėjimo laikas

T_v – Vykdyto laikas

A_A – Jautrumo įtampai koeficientas A puskanalio

A_B – Jautrumo įtampai koeficientas B puskanalio

V_{OA} – Įtampa, prie kurios A puskanalio laidumas sumažėja dvigubai

V_{OB} – Įtampa, prie kurios B puskanalio laidumas sumažėja dvigubai

G_{Ao} – Laidumas atidaryto (open) puskanalio A

G_{Bo} – Laidumas atidaryto (open) puskanalio B

G_{Ac} – Laidumas uždaryto (closed) puskanalio A

G_{Bc} – Laidumas uždaryto (closed) puskanalio B

κ – Konstanta reguliuojanti būsenų pasikeitimo skaičių per diskretinį laiko periodą

N – Kanalų skaičius

Šie parametrai priklauso nuo esamos būsenos ir skaičiuojami sekančiai:

$G_A = G_{Ao}$, jei puskanalis A yra atidarytas.

$G_A = G_{Ac}$, jei puskanalis A yra uždarytas.

$G_B = G_{Bo}$, jei puskanalis B yra atidarytas.

$G_B = G_{Bc}$, jei puskanalis B yra uždarytas.

$$V_A = \frac{V * \frac{1}{G_A}}{\frac{1}{G_A} + \frac{1}{G_B}}; V_B = \frac{V * \frac{1}{G_B}}{\frac{1}{G_A} + \frac{1}{G_B}}; G = \frac{G_A * G_B}{G_A + G_B}; V = V_A + V_B;$$

Stacionarioje būsenoje $A_c = K_1 * A_o$. Per laiko vienetą ΔT vidutiniškai $n_{o \rightarrow c}$ kanalų pereis iš **o** būsenos į **c** būseną ir $n_{o \rightarrow c} = A_o * \Delta T * P(A_{o \rightarrow c})$, kur A_o yra atidarytų puskanalių skaičius. Per tą patį laiką $n_{c \rightarrow o}$ kanalų pereis iš **c** būsenos į **o** būseną ir $n_{c \rightarrow o} = A_c * \Delta T * P(A_{c \rightarrow o})$, kur A_c yra uždarytų puskanalių skaičius.

Kadangi $n_{o \rightarrow c} = n_{c \rightarrow o}$, todėl seka, kad $P(A_{c \rightarrow o}) = P(A_{o \rightarrow c}) / K_1$.

Sakykime, kad $P(A_{c \rightarrow o}) + P(A_{o \rightarrow c}) = \kappa$.

κ yra tikimybė, kad $N * \kappa$ kanalų pakeičia būseną kai $K_1 = 1$. $1 - \kappa$ yra tikimybė, kad kanalai išlieka toje pačioje būsenoje.

Tada $P(A_{c \rightarrow o}) * K_1 + P(A_{c \rightarrow o}) = \kappa$, $P(A_{c \rightarrow o}) = \kappa / (1 + K_1)$, $P(A_{o \rightarrow c}) = \kappa * K_1 / (1 + K_1)$

1 Lentelė. Perėjimo tikimybės

Puskanalis	$P(o \rightarrow c)$ užsidaro	$P(o \rightarrow o)$ lieka atidarytas	$P(c \rightarrow o)$ atsidaro	$P(c \rightarrow c)$ lieka uždarytas
A	$\kappa * K_1 / (1 + K_1)$	$1 - P(A_{o \rightarrow c})$	$P(A_{c \rightarrow o}) = \kappa / (1 + K_1)$	$1 - P(A_{c \rightarrow o})$
B	$\kappa * K_2 / (1 + K_2)$	$1 - P(B_{o \rightarrow c})$	$P(B_{c \rightarrow o}) = \kappa / (1 + K_2)$	$1 - P(B_{c \rightarrow o})$

Modelio algoritmo pseudo kodas

```
{Visi kanalai yra būsenoje O(oo)}
```

```
V = Vmax;
```

```

while(V <= Vmax)
{
    //Kanalai nusistovi į pradinės būsenas
    for (int j = 0; j < T(0); j++)
        {
            {Visi kanalai pakeičia savo būsenas su įtampa
            lygia 0.}
        }

    //Kanalai pereidinėja į naujas būsenas
    for (int j = 0; j < T(v); j++)
        {
            {Visi kanalai pakeičia savo būsenas su įtampa
            lygia V.}
        }

    V += ΔV;
}

```

4. REZULTATAI

Aprašytas modelis imituoja plyšines tarpląstelines jungtis sudarytas iš pasirinkto skaičiaus (1-1000000) PJ kanalų. Kiekvienas kanalas gali būti vienoje iš keturių galimų būsenų su perėjimo konstantomis tarp būsenų. Jungties parametrai apibūdinami: A_A , A_B , V_{OA} , V_{OB} . Homotipiniuose kanaluose $A_A = A_B$ ir $V_{OA} = V_{OB}$. Perėjimų dažnis buvo 1/1000 kanalų per 1 ms. Laikas pasiekti stacionarinei būsenai buvo prilyginta 1000 ms (1000 ciklų).

Imitacijos sistema leido modeliuoti nuo 1 iki 1000000 kanalų su 4 būsenomis ir jungties parametrais: A_A , A_B , V_{OA} , V_{OB} . Mūsų gauti rezultatai modeliuojant $G_j(t)$ kitimo kinatikas ir $G_j(V_j)$ priklausomybė buvo panašūs į eksperimentinius duomenis iliustruotus Pav. 1A ir 1B ir anksčiau

aprašytus [6]. Žemiau yra pateikti imitacijos ir eksperimentų palyginimas (žiūr. Pav. 2). Lentelėje 2 yra parodyti parametrai.

2 Lentelė: Imitacinio modelio parametrai

Įvedimo parametrai	1 imitacija	2 imitacija
V_{\max}	100	100
V_{\min}	-100	-100
ΔV	10	10
T_0	1000	1000
$T(v)$	1000	1000
A_A	0.088	0.058
A_B	0.027	0.058
V_{OA}	22.3	61.3
V_{OB}	125.3	61.3
G_{Ao}	2.1	2
G_{Bo}	2.1	2
G_{Ac}	0.5	0.35
G_{Bc}	0.5	0.35
κ	0.001	0.001
N	300	300

Duomenys rodo jog eksperimento ir imitacijos rezultatai yra panašūs. Pastebimi skirtumai galėjo būti apsprendti netiksliai užduoti parametrai. Kad sumažinti G_j/V_j priklausomybes variacija ir neprailginti skaičiavimo laiko mes modeliavome 300 kanalų. A_A , A_B , V_{OA} , V_{OB} parametrai buvo paimti iš Chen-Izu ir kt. publikacijos [6].

5. IŠVADOS

Imitacinis modeliavimas aproksimuoja eksperimentinius duomenis ir gali įvertinti heterotipinių PJ vartų priklausomybes nuo įtampos reguliacija remiantis homotipinių PJ savybėmis.

Aprašant vartų sąveika plyšineje jungtyje atsižvelgta į įtampos persiskirstymo kanale priklausomai nuo puskanalių laidumų atviroje arba uždaroje būsenose. Tai realizuojama imitaciniame modelyje, bet būtų sudėtinga ar neįmanoma aprašyti analitiniame modelyje. Imitacinis modelis mums leido aprašyti bendresnį vartų sąveikos variantą, pagrįsta įtampos persiskirstymu, nei [6].

6. LITERATŪRA

- [1] **Paul D. L.** Molecular cloning of cDNA for rat liver gap junction protein. 1986.
- [2] **Harris A. L.** Emerging issues of connexin channels: biophysics fills the gap. *Q. Rev. Biophys.* 34:325-427. 2001.
- [3] **Sohl G., and K. Willecke** Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc. Res.* 62(2):228-32. 2004.
- [4] **Rackauskas M, Kreuzberg MM, Pranevicius M, Willecke K, Verselis VK, Bukauskas FF.** Gating properties of heterotypic gap junction channels formed of connexins 40, 43 and 45. 2006.
- [5] **Bukauskas FF, Angele AB, Verselis VK, Bennett MV.** Coupling asymmetry of heterotypic connexin 45/ connexin 43-EGFP gap junctions: properties of fast and slow gating mechanisms. 2002.
- [6] **Ye Chen-Izu, Alonso P. Moreno, Robert A. Spangler.** Opposing gates model for voltage gating of gap junction channels. 2001.

We developed an opposing gates model for voltage gating of homotypic and heterotypic gap junction (G_j) channels that are oligomers of connexin protein. The model is similar to the one described earlier by Chen-Izu et al. ([6]) but uses imitative approach and accounts for voltage distribution inside the pore of the G_j channel. Simulation yields steady state dependence of junction conductance on transjunctional voltage (G_j/V_j relationship) and been used to reproduce experimental steady state G_j/V_j relationship in HeLa cells expressing connexins 31 and 45. Obtained data demonstrate that proposed model could be used to predict gating in the heterotypic gap junctions from the characteristics of corresponding homotypic GJ channels.