

Die Feed-forward-Schleife: Struktur, Dynamik und Funktionen

Fabian Buske ^a

^aSeminar: Wie Zellen denken - WS 2005/06 FU-Berlin

ABSTRACT

Elektronische Schaltkreise werden oftmals mit kleinen wiederverwertbaren Schaltkreismodulen, die eine Schlüsselfunktion in sich tragen, konstruiert. In Transkriptionsnetzwerken, die das Antwortverhalten von lebenden Zellen steuern, wurden ähnliche Prinzipien kürzlich ebenfalls entdeckt. Dabei wird die Verdrahtung zur Kommunikationsweiterleitung durch biochemische Signale gewährleistet. Mehrere im Netzwerk enthaltene biochemische Muster, sogenannte Netzwerk motive, stellen eigene kleine Schaltmodule dar. Eine Gruppe von Netzwerk motiven sind die Feed-forward Schleifen (FFL). Eine Feed-forward Schleife ist ein Drei-Gene Muster, wobei ein Transkriptionsfaktor einen zweiten Transkriptionsfaktor und beide zusammen ein Zielgen regulieren. Diese Regulation kann sowohl aktivierenden (+) als auch inhibierenden (-) Character haben. Aufgrund der drei Signalwege können 2^3 Verschaltungsmöglichkeiten realisiert werden. Inkohärente Feed-forward Schleifen agieren dabei als vorzeichen-sensitive Beschleuniger, indem sie die Antwortzeit des Zielgens nach einem gegebenen Stimulus in eine Richtung (z.B. Anschaltung) beschleunigen in die andere (z.B. Abschaltung) jedoch nicht. Die kohärenten Feed-forward Schleifen hingegen dienen als vorzeichen-sensitive Verzögerungselemente. Es wurde entdeckt, dass einige Feed-forward Schleifen in Datenbanken von Transkriptionsnetzwerken bedeutend häufiger enthalten sind als andere. In dieser Arbeit werden die Eigenschaften der Feed-forward Schleife diskutiert. Zusätzlich wird auf Merkmale wie Pulsgenerierung und Kooperativität dieser signifikantesten aller Schaltkreiselemente eingegangen.

1 INTRODUCTION

Biologische Zellen enthalten Netzwerke biochemischer Transkriptionsinteraktionen. Diese Transkriptionsnetzwerke stellen informationsverarbeitende Prozesse dar, die auf einen Input mit veränderter Transkriptionsaktivität reagieren können. Dabei wird durch die Bindung an spezifischen Genen für eine Inputfunktion (Aktivierung/Reprimierung) eine Zellantwort ausgelöst. Inputfunktionen wie z.B. Umweltfaktoren, Stress und Nahrungsmittelangebot bestimmen die Aktivität von Transkriptionsfaktorproteinen. Diese Transkriptionsfaktoren binden regulatorische Regionen spezifischer Gene und steuern darüber die Transkription dieses Gens. Die Zellantwort wird moduliert.

Ein solches Transkriptionsnetzwerk kann als gerichteter Graph modelliert werden, wobei die Gene die Knoten und die Interaktionen die Kanten darstellen.

Es wurden in Transkriptionsnetzen kleine wiederholt vorkommende Muster erkannt, deren Vorkommen signifikant gegenüber Zufallsnetzwerken sind. Diese Muster werden „Netzwerk motive“ genannt. Es stellt sich die Frage, ob und welche informationsverarbeitenden Prozesse in diesen Netzwerk motiven verarbeitet werden.

Feed-forward Schleifen stellen eines der kleinsten wiederkommender Muster in Transkriptionsnetzen dar, die verzögernde, beschleunigende oder pulsierende Effekte im Transkriptionsprozess eines Gens hervorrufen können. Eine Feed-forward Schleife (Abb. 1) besteht aus zwei Transkriptionsfaktoren X und Y, die beide ein gemeinsames Zielgen Z steuern. Zusätzlich beeinflusst jedoch einer der Transkriptionsfaktoren (X) noch den anderen (Y). Aus den drei Transkriptionsinteraktionen und den jeweils zwei Steuermöglichkeiten (aktivierend (+) bzw. inhibierend (-)) ergeben sich daher $2^3 = 8$ Strukturkonfigurationen. Zusätzlich können die zwei beim Zielgen eingehenden Signale per logischer UND- bzw. ODER-Schaltung gekoppelt sein. Die Transkriptionsfaktoren X und Y werden ihrerseits durch die Inducer S_x und S_y in einen aktiven Zustand versetzt. Inducer sind kleine Moleküle, Proteinpartner oder kovalente Modifikationen, die die Transkriptionsaktivität von X und Y aktivieren oder inhibieren.

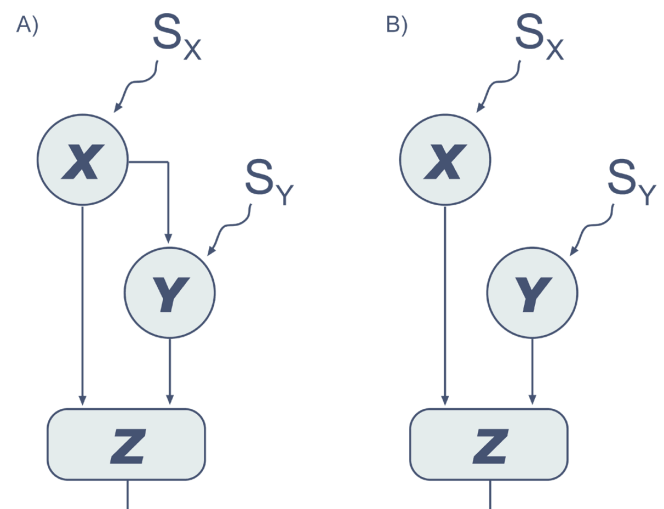


Abbildung 1. A) Aufbau der Feed-forward Schleife: S_x und S_y sind die Inducer der Transkriptionsfaktoren X und Y. Transkript X wirkt auf das Expressionsverhalten von Y und beide zusammen steuern das Zielgen Z. B) Im Vergleich eine einfache Verschaltung, bei der die Transkriptionsfaktoren X und Y lediglich auf das Zielgen Z wirken.

Abb. 2 stellt alle acht möglichen Strukturkonfigurationen dar. Haben sowohl der direkte Signalweg von X nach Z als auch der indirekte Signalweg von X über Y nach Z das gleiche Vorzeichen, so wird die Feed-forward Schleife als kohärent bezeichnet. Andernfalls

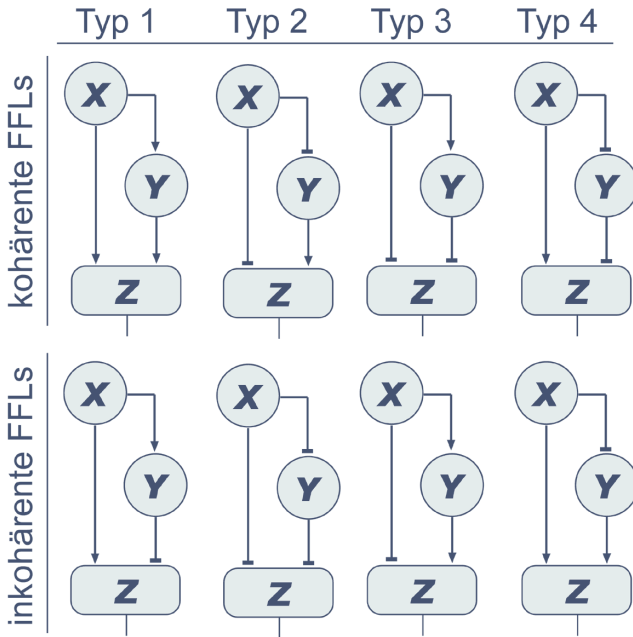


Abbildung 2. Bei den kohärenten Feed-forward Schleifen sind die Vorzeichen beider Wege nach Z gleich (von X nach Z und von X über Y nach Z), wohingegen bei den inkohärenten Feed-forward Schleifen genau das Gegenteil der Fall ist.

wird die Feed-forward Schleife inkohärent genannt. Es gibt insgesamt vier kohärente und vier inkohärente Feed-forward Schleifen.

Die Effekte der Transkriptionsfaktoren X und Y sind in der Promoterregion des Zielgens Z integriert. Die Menge der Expression von Z wird direkt über die Konzentration der X und Y Transkripte moduliert, die wiederum an ihren Inducer gebunden sein müssen. Die cis-regulatorische Inputfunktion kann als UND-Funktion verstanden werden, bei der beide Konzentrationen der Transkripte X und Y in ausreichender Menge vorliegen müssen, um Z zu exprimieren, bzw. als ODER-Funktion, bei der die Gegenwart von einem Transkript (X oder Y) ausreicht um Z zu produzieren. Das mathematische Modell in dieser Studie betrachtet alle acht Strukturkonfigurationen mit UND- bzw. ODER-Verschaltung. Es wurde beobachtet, dass inkohärente Feed-forward Schleifen ein Mechanismus für die Beschleunigung der Expression des Zielgenes ist. Kohärente Feed-forward Schleifen dienen hingegen zum Verzögern der Expressionsantwort. Beide Typen arbeiten vorzeichensensitiv. Das bedeutet, die Beschleunigung bzw. Verzögerung arbeitet nur in eine Richtung in Bezug auf den Stimulus. Die Funktion einer Konfiguration für UND- bzw. ODER-Verschaltung ist essentiell die gleiche, lediglich die Vorzeichensensitivität ist vertauscht.

2 METHODS

Mathematisches Modell. Zur mathematischen Modellierung kann auf Differentialgleichungen zurückgegriffen werden. Die aktive Form von X und Y wird mit X^* bzw. Y^* gekennzeichnet. Zur Vereinfachung wird angenommen, dass $S_x \rightarrow X$ und $S_y \rightarrow Y$ derart aktivieren, dass $X^* = X$, wenn $S_x = 1$ und $X^* = 0$ für $S_x = 0$ gilt. Analog wird für S_y und Y verfahren. Desweiteren wird angenommen, das X durchgehend produziert wird und in

der Zelle ausreichend vorherrscht ($X = 1$). Die Konzentrationen von Y und Z werden durch die kinetischen Gleichungen (1) und (2) beschrieben.

$$\frac{dY}{dt} = B_Y + \beta_Y f(X^*, K_{XY}) - \alpha_Y Y \quad (1)$$

$$\frac{dZ}{dt} = B_Z + \beta_Z f(X^*, K_{XZ}, Y^*, K_{YZ}) - \alpha_Z Z \quad (2)$$

Die regulatorische Funktion für einen Aktivator lautet:

$$f(u, K) = \frac{\left(\frac{u}{K}\right)^H}{1 + \left(\frac{u}{K}\right)^H} \quad (3)$$

Die regulatorische Funktion für einen Repressor unterscheidet sich geringfügig:

$$f(u, K) = \frac{1}{1 + \left(\frac{u}{K}\right)^H} \quad (4)$$

Die Gatter-Funktion für eine UND-Verschaltung ist:

$$G_Z = f(X^*, K_{XZ})f(Y^*, K_{YZ}) \quad (5)$$

Für eine ODER-Verschaltung wird folgende Gleichung verwendet:

$$G_Z = f_c(X^*; K_{XZ}, K_{YZ}, Y^*) + f_c(Y^*; K_{YZ}, K_{XZ}, X^*) \quad (6)$$

wobei sich f_c für einen Aktivator definiert aus:

$$f_c(u; K_u, K_v, v) = \frac{\left(\frac{u}{K_u}\right)^H}{1 + \left(\frac{u}{K_u}\right)^H + \left(\frac{v}{K_v}\right)^H} \quad (7)$$

für einen Repressor entsprechend:

$$f_c(u; K_u, K_v, v) = \frac{1}{1 + \left(\frac{u}{K_u}\right)^H + \left(\frac{v}{K_v}\right)^H} \quad (8)$$

B_Y und B_Z stellen die basalen Transkriptionsraten von Y und Z dar. α_Z setzt sich aus der Degradationsrate α_{deg} und der Dilutionsrate α_{dil} (Verwässerungsrate) des Proteins Z bei der Zellteilung zusammen. Entsprechendes gilt für α_Y .

$$\alpha_Z = \alpha_{deg} + \alpha_{dil} \quad (9)$$

Nach Einstellung der Produktion von Z wird die Abbaurrate bestimmt durch:

$$Z = Z_{t=0} e^{-\alpha_Z t} \quad (10)$$

wonach die Hälfte der Z-Konzentration nach $t = \frac{\log(2)}{\alpha_Z}$ erreicht wird. Diese Zeit wird als Lebenszeit von Protein Z definiert. Ähnlich wird mit Y verfahren.

Typ-1 kohärente FFL mit UND-Gatter: Ecolis L-arabinose Pathway.

Eine Typ-1 Feed-forward Schleife wurde am Modell des L-arabinose-Pathway des Ecoli untersucht und dem adäquaten Lactose-Pathway gegenübergestellt. In beiden Fällen ist eine Verschaltung über ein UND-Gatter realisiert (Abb. 3). Beim L-arabinose Pathway agiert der Transkriptionsfaktor CRP als Aktivator, wenn er an seinem Inducer cAMP gebunden ist. Das cAMP entsteht bei Glucosemangel, z.B. bei Wachstum des Ecoli auf einem Glycerol-Nährboden. Bei einem Glucose-Nährboden wird die cAMP-Produktion hingegen unterdrückt. CRP bindet am araC Promotor und verstärkt die Transkription von AraC. Transkriptionsfaktor AraC agiert als Aktivator für das araBAD-Operon, wenn es den Zucker L-arabinose gebunden hat.

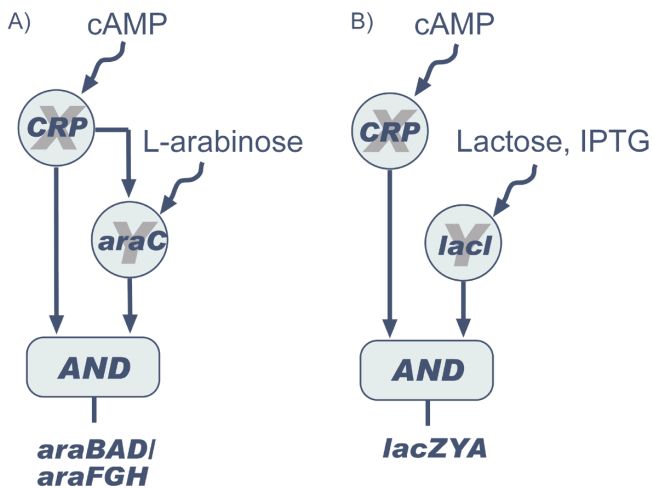


Abbildung 3. A) Ecoli L-arabinose Feed-forward Schleife B) Ecoli Lactose Pathway - Jeweils beide Transkriptionsfaktoren X (CRP) und Y (araC bzw. lacI) sind mittels einem UND-Gatter auf das jeweilige Zielgen verknüpft. Für eine erfolgreiche Expression des Zielgens müssen demzufolge beide Transkriptionsfaktoren vorliegen.

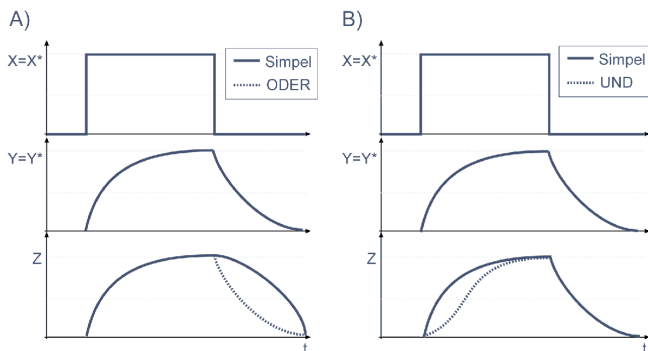


Abbildung 4. A) Verzögerter Abbau der Z-Konzentration bei der Type-1 kohärenten FFL mit ODER-Gatter B) Verzögerte Produktion der Z-Konzentration bei der Type-1 kohärenten FFL mit UND-Gatter, jeweils mit Vergleich zu einem simplen Modell mit Abhängigkeit zu lediglich einem Stimulus. In den vertikalen Achsen sind jeweils die Konzentrationen abgetragen.

Als Kontrollstruktur wurde ein nicht-FFL-System mit einem identischen Input für S_x gewählt. Das Lactose System ist mit einer einfachen UND-Verschaltung realisiert. CRP und LacI regulieren zusammen das lacZYA Operon, ohne das LacI zusätzlich durch CRP transkriptionell beeinflusst wird. Über den Einbau eines Reportergens im Plasmid (Green fluorescent Protein) wurde das Expressionslevel über optische Absorption gemessen.

Abb. 4B visualisiert die Verzögerung, die eine FFL-UND-Verschaltung gegenüber der simplen UND-Verschaltung beim Produktionsstart des Zielgens verursacht.

Typ-1 kohärente FFL mit ODER-Gatter: Ecolis Flagellensystem. Der einfachste Weg eine additive Inputfunktion für ein Zielgen zu realisieren, ist der Einbau zweier unterschiedlicher Promotoren, die auf jeweils eigene Stimuli reagieren. Das Ergebnis dieser Konfiguration ist eine Verzögerung des Abbaus der Z-Konzentration, da nach der Inaktivierung von X noch ein

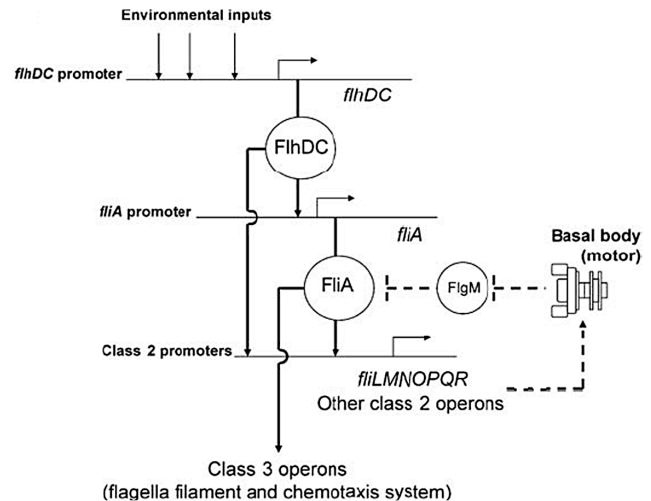


Abbildung 5. Mechanismus der Flagellenproduktion im Ecoli. Quelle siehe [1]

Zeitraum verstreicht, bis das Y-Level soweit abgebaut wurde, dass eine Deaktivierung von Z eingeleitet wird. Die Flagellensynthese des Ecoli wartet mit diesem Mechanismus auf (Abb. 5). Der Transkriptionsfaktor FlhDC wird durch Umweltfaktoren wie Nahrungsmittelangebot, Bevölkerungsdichte ect. aktiviert bzw. deaktiviert. Aktiviertes FlhDC-Transkript stimuliert den fliLMNOPQR-Promotor, der für die Ausbildung des Basalkörpers des Flagellenmotors verantwortlich ist. Gleichzeitig wird von FlhDC der fliA Transkriptionsfaktor stimuliert, der ebenfalls die Ausbildung des Flagellenmotors stimuliert, darüberhinaus aber noch die Flagellengeißelproduktion einleitet. Der Transkriptionsfaktor fliA wird jedoch durch FigM inhibiert, der mit Erscheinen des Basalkörperproduktes jedoch seinerseits von diesem inhibiert wird. Dieser Mechanismus ermöglicht die zeitliche Abstimmung der Produktion des Basalmotors und der darauf aufsitzenden Geißel.

Für das Kontrollnetzwerk dient dasselbe Netzwerk als Grundlage, jedoch wird das fliA-Gen entfernt. Damit verliert das Transkriptionsnetz automatisch seinen additiven Charakter.

Abb. 4A visualisiert die Verzögerung beim Abbau der Z-Konzentration einer ODER-Verschaltung gegenüber einem nicht additiven System.

3 RESULTS

Die Durchführung von Experimenten dient der Bestätigung des mathematischen Modells. Dabei liegt der Focus auf der Bestätigung der Netzkonfiguration. Stimmen Theorie und experimentelle Daten nicht überein, so muss davon ausgegangen werden, dass Aspekte in der Zellkommunikation übersehen wurden und daher im mathematischen Modell keine Berücksichtigung fanden.

Typ-1 kohärente FFL mit UND-Gatter: Ecolis L-arabinose Pathway. Abb. 6 zeigt die Auswertung der experimentelle Daten für die UND-Verschaltung. Es ist deutlich zu sehen, dass es eine Verzögerung beim on-step des Stimulus bzgl. des araBAD Promotors gibt. Betrachtet wird die Zeit bis zum Erreichen der Hälfte der Konzentration des „steady state“¹. Beim off-step hingegen ist

¹ Unter „steady state“ versteht man das Gleichgewicht, auf das sich die Konzentration des Zielgens in der Zelle einstellt, wenn alle Bedingungen für die Expression erfüllt sind. Es ergibt sich aus der Produktion des Proteins und seiner Abbaurrate.

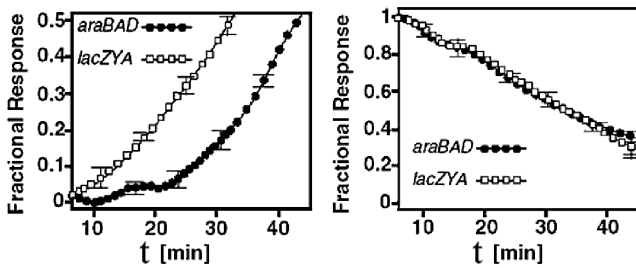


Abbildung 6. Experimentelle Ergebnisse für das L-arabinose System. Quelle siehe [1]

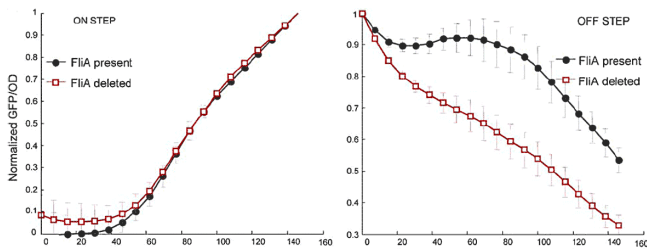


Abbildung 7. Experimentelle Ergebnisse für das Flagellensystem. Quelle siehe [3]

keine Abweichung zum Kontrollnetzwerk auszumachen. Die Modulierung der Zellantwort ist demzufolge Vorzeichensensitiv und tritt nur beim on-step auf.

Typ-1 kohärente FFL mit ODER-Gatter: Ecolis Flagellensystem. Beim ODER-Gatter untermauern die experimentellen Daten ebenfalls das mathematische Modell (Abb. 7). Die Verzögerung tritt hier ausschließlich im off-step auf. Im on-step ist kein signifikanter Unterschied zwischen dem ODER-Modell und dem einfachen Kontrollnetz auszumachen. Die ODER-Verschaltung ist damit ebenso wie die UND-Verschaltung vorzeichensensitiv in bezug auf den Stimulus, jedoch sind die Vorzeichen zwischen beiden Verschaltungsmodellen invers.

4 DISCUSSION

Die Anwesenheit einer Feed-forward Schleife im ara-System bedarf der Klärung seiner biologischen Funktion. Die UND-Verschaltung ist ein Mittel zur Entscheidungsfindung bei zwei Input-Stimuli. Sie dient der Berechnung, ob ein System angeschaltet werden soll oder nicht. Für diesen Zweck ist eine einfache UND-Verschaltung jedoch ausreichend. Bei der Feed-forward Vernetzung liegt die Besonderheit in der teilweisen Regulation von Y durch X, die dem Bakterium einen Vorteil verschaffen muss, ansonsten würde dieses Merkmal in der Evolution keinen dauerhaften Bestand haben. Ein Erklärungsansatz liegt in einer erhöhten Anzahl von Kopien des Zielproteins, wenn beide Systeme aktiv sind. Ein weiterer Ansatz geht von einem Vorteil einer asymmetrischen Antwort auf Stimuli bei plötzlich veränderten Umweltbedingungen für das Bakterium aus. Das Ecoli durchläuft zwei Lebensphasen. Eine Lebensphase im Körper des Säugetierwirts und eine außerhalb. Im Körper des Wirts sind reiche Zuckervorkommen wie L-arabinose, aber nur

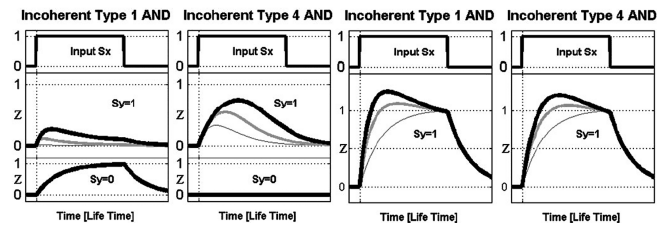


Abbildung 8. Visualisierung der Pulsgeber. Quelle siehe [2]

geringe Vorkommen von Glucose vorhanden. Das ara-System arbeitet daher die vorherrschende Zeit, wenn beide Inducer present sind (cAMP und L-arabinose). Sobald Glucose verfügbar ist, resultierend in einem cAMP-off-step, wird es sofort aufgenommen. Zu diesem Zeitpunkt wird das ara-System nicht mehr benötigt und eine rasche Einstellung der Produktion entsprechenden Proteine kann erfolgen. Dies spart (Synthese-)Energie. Glucosepräsenz ist jedoch ein zeitlich stark beschränktes Phänomen, da sowohl Bakterium als auch Wirt effiziente Mechanismen haben, um Glucose zu verwerten. Vollkommen erschöpfte Glucosevorkommen resultieren in einem cAMP-on-step. Eine Verzögerung beim Produktionsstart kann verkraftet werden, da durch die kurzzeitigen Glucoseimpulse mit recht hoher Wahrscheinlichkeit noch genügend L-arabinose verwertende Proteine vorhanden sind. Eine kurze Hungerphase kann das Ecoli zudem verkraften.

Beim Flagellensystem des Ecoli stellt sich die Frage, warum nach Abschaltung des Master Regulators X noch weiterhin Flagellen hergestellt werden sollten. Die Produktion des Flagellenmotors wird durch diverse Umweltfaktoren gesteuert. Diese Faktoren fluktuieren in der Umgebung, besonders bei der Fortbewegung. Die additive Kopplung aller dieser Faktoren sorgt dafür, dass der Flagellenproduktionsmechanismus unempfindlich für kurzzeitige Verbesserung der Umweltbedingungen ist, bei denen X deaktiviert wird. Das Flagellensystem wird erst deaktiviert, wenn eine ausreichend lange Zeit gute Bedingungen vorherrschten.

Feed-forward Schleifen dienen also als eine Art Persistenzdetektor. Abbildung 9 zeigt eine Übersicht über alle acht Konfigurationen von Feed-forward Schleifen und ihres jeweiligen Verhaltens bei UND- bzw. ODER-Verschaltung.

Es wurde beobachtet, dass inkohärente Feed-forward-Schleifen als Pulsgeber agieren können (Abb. 8A). Besonders gute Pulsgeber sind Typ-3 und Typ-4. Bei der Typ-4 inkohärenten Feed-forward Schleife wird beispielsweise Z beim Anschalten von S_x anfangs über die beiden Transkriptionsfaktoren X und Y positiv stimuliert. Da jedoch X auf Y reprimierend wirkt, sinkt die Konzentration von Y und aufgrund der UND-Verschaltung damit auch die des Zielgens wieder ab. Bei einem on-step von X und der Präsenz von Y steigt die Produktion von Z demzufolge erst an und sinkt dann wieder. Typ-1 und Typ-2 inkohärente FFL sind hingegen relative schwache Pulsgeber.

Inkohärente Feed-forward Schleifen können zudem für eine Beschleunigung der Zellanwort dienen. Der Typ-1 inkohärente FFL zeigt bei basaler Y Aktivität und UND-Verschaltung einen anfänglichen Anstieg bei Zugabe von S_x . Mit steigender Produktion von Y sinkt jedoch die Z-Konzentration auf ein Level ungleich Null

Species	Coherent type 1		Coherent type 2		Coherent type 3		Coherent type 4	
	Structure	Abundance	Structure	Abundance	Structure	Abundance	Structure	Abundance
<i>E. coli</i>		28		2		4		1
<i>S. cerevisiae</i>		26		5		0		0
Z Logic →	AND	OR	AND	OR	AND	OR	AND	OR
Steady-state Z(Sx,Sy)	$S_x \wedge S_y$	S_x	$\bar{S}_x \wedge S_y$	\bar{S}_x	\bar{S}_x	$\bar{S}_x \wedge \bar{S}_y$	S_x	$S_x \vee \bar{S}_y$
Response delay								
Sx on step	Delay	—	—	Delay	—	—	Delay	Delay
Sx off step	—	Delay	Delay	—	Delay	Delay	—	—
Inverted out	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes	No	No
Species	Incoherent type 1		Incoherent type 2		Incoherent type 3		Incoherent type 4	
	Structure	Abundance	Structure	Abundance	Structure	Abundance	Structure	Abundance
<i>E. coli</i>		5		0		1		1
<i>S. cerevisiae</i>		21		3		1		0
Z logic →	AND		AND		AND		AND	
Steady-state Z(Sx,Sy)	$S_x \wedge \bar{S}_y$		$\bar{S}_x \wedge \bar{S}_y$		0		0	
Pulse								
Sx on step	Weak		—		—		Strong	
Sx off step	—		Weak		Strong		—	
Sy effect	Destroy		Destroy		Enable		Enable	
Response acceleration								
Sx on step	Accelerate		—		—		Accelerate	
Sx off step	—		Accelerate		Accelerate		—	

Abbildung 9. Übersicht über alle Typen von Feed-forward Schleifen. Quelle siehe [2]

(Abb. 8B). Die Zellanwort ist interessanterweise schneller als in einem vergleichbaren simpel regulierten System. Als vergleichbares System wurde hierbei ein simples System und eine FFL mit gleichem „steady state“-Level betrachtet. Daher muss der Z-Promoter sehr stark sein, um den reprimierenden Effekt von Y kompensieren zu können. Die Z-Konzentration steigt dadurch anfangs sehr schnell und wird dann durch den Repressor Y gestoppt.

5 CONCLUSION

Feed-forward Schleifen sind kleine Netzwerkkomponenten, die in die zwei Kategorien kohärente und inkohärente FFL unterteilt werden. Kohärente Feed-forward Schleifen verzögern die Zielgenantwort vorzeichensensitiv. Inkohärente Feed-forward Schleifen beschleunigen hingegen die Zielgenantwort oder dienen als Pulsgeber. Die Verschaltung zwischen den zwei Transkriptionsfaktoren

X und Y auf den Zielgenpromotor kann per UND- bzw. ODER-Gatter erfolgen. Die Typ-1 kohärente Feed-forward Schleife wurde am häufigsten in der Natur beobachtet. Der Grund kann in der Kooperativität seiner Transkriptionsfaktoren gefunden werden. Eine Vielzahl der Feed-forward Schleifen kann als Persistenzdetektor fungieren.

LITERATUR

- [1]U. Alon S. Mangan, A. Zaslaver. The coherent feedforward loop serves as a sign-sensitive delay element in transcription networks. *Journal Molecular Biology*, pages 197–204, 2003.
- [2]U. Alon S. Mangan. Structure and function of the feed-forward loop network motif. *PNAS*, 2004.
- [3]Uri Alon Shiraz Kalir, Shmoolik Mangan. A coherent feed-forward loop with a sum input function prolongs flagella expression in escherichia coli. *Molecular Systems Biology*, 2005.