

Soluble type의 human folate receptor의 folate 결합과 수송에 관한 특성

김 원 신
원광대학교 자연과학대학 생명과학부

Characterization of Soluble Type Human Folate Receptor on Folate Binding and Transport

Won-Sin Kim

Division of life Science, College of Natural Sciences, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea
(Received July 28, 1998)
(Accepted August 31, 1998)

ABSTRACT : We have cloned a soluble type human folate receptor (hFR type γ) from human thymus cDNA library using the PCR amplification technique. To examine whether hFR type γ has a folate transport activity, CHO cells were transfected with the pcDNAhFR γ expression plasmid, and the stable cell line CHO/hFR γ expressing a high level of the hFR type γ was identified by northern and western blot analysis. The CHO/hFR γ cells produced a [H^3] folic acid binding protein in the culture medium. However, we couldn't detect any cell surface [H^3] folic acid binding and transport activities. The growth of the CHO/hFR γ cells was more rapidly inhibited than the wild type CHO cells in the low concentration folic acid media. These observations indicate that although soluble type human folate receptor can bind [H^3] folate, it does not involve in folate transport.

Key Words : Human folate receptor, Folate-binding protein, Antifolates, Transport, Chemotherapy

I. 서 론

Folate와 methotrexate(MTX)와 같은 antifolates의 세포내 수송은 2가지의 transport system이 관여하고 있는 것으로 알려져 있다. 그 첫 번째 system은 몇 가지의 isoform의 folate receptor에 의한 binding protein-mediated 경로이고(Ross *et al.*, 1994, Wang *et al.*, 1992), 다른 하나는 환원형의 folate carrier anion exchange system이 관여된 특수한 transport system이다(Henderson *et al.*, 1980; Westerhof *et al.*, 1991). 세포내의 folate의 농도의 상승은 DNA와 RNA의 합성에 아주 중요하기 때문에 이들 folate transport 경로는 비상한 관심을 끌었다. Human folate receptor(hFR)은 glycosylphosphatidyl inositol(GPI) anchor에 의하여 막에 결합되어있는 glycoprotein으로 folates와 methotrexate(MTX)와 같은 antifolates의 세포내로의 수송에 관여하기 때문에 antifolate에 대한 세포독성에 있어서 매우 중요한 약리적인 결정인자로서 주목받고 있다(Antony *et al.*, 1991;

Jansen *et al.*, 1990; Westerhof *et al.*, Luhrs *et al.*, 1992, Matsue *et al.*, 1992). 이들 folate receptor는 hFR type α , hFR type β , hFR type γ 의 3개의 isoforms이 존재하는 것으로 알려져 있는데, 이들 isoform은 각각 KB cell(human nasopharyngeal epidermoid carcinoma) (Elwood, 1989; Sadasivan *et al.*, 1989), placenta (Ratnam *et al.*, 1989) 그리고 human hematopoietic tissue의 cDNA library(Shen *et al.*, 1994)로부터 각각 분리되었다. 이들 중 가장 잘 그 특성이 알려져 있는 것은 hFR type α 로써 분자량이 약 28-kDa로 3개의 N-linked glycosylation 을 가지고 있으며 25잔기의 leade peptide 그리고 8개의 hydrophilic spacer sequence와 16잔기의 α -herical hydrophobic carboxyl terminus를 갖고 있다(Campbell *et al.*, 1991; Coney *et al.*, 1991; Elwood, 1989; Lacey *et al.*, 1989; Sadasivan *et al.*, 1989).

이들 hydrophobic carboxyl terminus는 folate receptor에서 glycosylphosphatidyl inositol(GPI) tail의 첨가의 중요한 signal로써 작용하는 것으로 이들 GPI-tail은 human folate receptor를 plasma membrane에 부착시키는데 필요한 것으로 알려져 있다(Furukawa *et al.*,

*To whom correspondence should be addressed.

1997). Human folate receptor의 isoforms들은 조직 특이적으로 발현되는 것으로 알려져 있는데 hFR type α 는 각종 carcinomas들과 epithelial cells의 primary cultures에서 그 발현이 증가되어 있고(Ross *et al.*, 1994) hFR type β 는 nonepithelial 기원의 malignant tumors에서 그 발현이 증가되어 있는 것으로 알려져 있다. 그러나, hFR type γ 는 hematopoietic 조직들에서 아주 특이적으로 발현되고 있는 것으로 알려져 있다(Shen *et al.*, 1994). 이 hFR type γ 는 hFR type α 와 β 에 비교하여 hydrophobic terminus의 아미노산이 truncate되어 있어서 soluble type의 human folate receptor인 것으로 추정되고 있다(Shen *et al.*, 1995).

그러나 이 soluble type의 hFR type γ isoform은 malignant hematopoietic tissues에서 특이적으로 발현되고 있는 것으로 알려져 있어서 이런 조직들의 malignancies에 대한 serum marker로 주목을 받고 있으나(Shen *et al.*, 1995) 그 기능에 대하여서는 아직도 알려져 있지 않았다. 따라서 본 연구에서는 이들 soluble type의 human folate receptor의 기능을 알아보기 위하여 그 cDNA를 인간의 thymus cDNA library로부터 분리하여 CHO cells에서 발현시켜서 그 생리적인 특성을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

[³H] folic acid는 Moraveck Biochemicals, [³⁵S] Met는 ICN, [α -³²P] dCTP와 dGTP(specific activities, >800 Ci/mM)는 Amersham사로부터 각각 구입하였다. 그 외에 다른 모든 시약은 Sigma사와 Fisher Scientific사로부터 구입하였다.

2. cDNA Cloning

Soluble type의 hFR의 전 coding영역을 포함하는 cDNA를 cloning하기 위하여 다음과 같은 2개의 primers(sense : GGGAAGCTTCGCAGGAATAGATG-GACATGGCCTG, antisense : GGGCTCGAGTTCAT-GTGGATTTGTCTATTAGAATAG)를 이용하여 인간의 thymus cDNA library로부터 PCR을 시행하여 얻어진 PCR 산물은 Hind III와 Xho I으로 절단하여 pcDNA3 vector의 Hind III와 Xho I site에 subcloning하였다. 제작된 plasmid는 DNA sequencing으로 sense orientation 및 PCR의 오류를 확인하여 정확한 염기서열

을 갖는 plasmid를 선정하여 pcDhFR γ 로 정하였다.

3. Tissue Culture Reagents

2 μ M의 folic acid가 포함되어 있는 standard replete minimal essential media(RMEM); folic acid가 포함되어 있지 않은 deplete minimal essential media(DMEM); serum free medium인 CHO-SFM-II; trypsin versene solution(2.5%); penicillin/streptomycin/fungizone(PSF) solution(100x); fetal calf serum(FCS); 그리고 geneticin sulfate(antibiotic G 418, Gibco#860-1811IJ)는 GIBCO Laboratories로부터 구입하였다.

4. Tissue Culture

CHO cells은 약 200 nM의 folic acid가 포함되어 있는 minimal essential media(9/10 DMEM, 1/10 RMEM, 그리고 10% FCS)에서 배양하였다. 세포는 10-cm tissue culture dishes에 약 10 ml의 배지를 넣어 5%의 CO₂ incubator에서 일주일마다 계대배양 하였다. 세포를 harvest하기 위하여 1~2 ml의 2.5% trypsin versene solution을 가하여 실온에서 약 2분간 방치한 후 media로 즉각적으로 resuspend하였다.

5. Calcium Phosphate Transfection

CHO cells에 transfection하여 안정되게 folate를 발현하는 세포주를 얻기 위하여 calcium phosphate 방법을 이용하여 10 μ g의 pcDhFR γ plasmids를 transfection시켰다. 안정된 transfectants는 200 μ g/ml에서 1,000 μ g/ml G418(Gibco)의 농도까지 서서히 올려서 선별하였고 안정되게 발현하는 세포주는 250 μ g/ml G418을 포함되어 있는 배양액에서 배양하여 유지시켰다.

6. Cell-surface Folic Acid Binding Assay

6 well plate에 약 75% 정도로 세포밀도를 맞추고 [³H] folic acid의 cell-surface assay를 실시하였다. 세포는 세포표면의 folic acid receptor에 결합되어 있는 folic acid를 제거하기 위하여 ice-cold pH 4.5 saline(10 mM Na-acetate, 150 mM NaCl)으로 2회 세척하고 pH를 중성으로 돌리기 위하여 ice-cold PBS로 2회 세척하였다. Radio-label된 folic acid의 cell-surface binding assay를 위하여 20,000 cpm의 [³H] folic acid를 포함하고 있는 2 ml의 ice-cold DMEM(without FCS)로 15분

동안 ice-cold H₂O속에서 incubation하고 ice-cold PBS로 2회 세척하였다. 세포들은 ice-cold PBS(1% Triton X-100, 0.3% PMSF)로 가용화하고 4°C, 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하고 상등액은 scintillation counter에서 측정하였다.

7. Folic Acid Binding Assay

배양액중에 분비된 folic acid receptor의 folic acid binding affinity를 측정하기 위하여 세포는 DMEM (without folic acid, 1% FCS)에서 배양하고 배양액을 회수하여 ice-cold acid saline(10 mM Na-acetate, 150 mM NaCl)에서 3회 투석하고 ice-cold PBS(pH 7.4)로 2회 투석하여 folic acid binding activity를 측정하였다. 20 µg/ml protein을 포함하고 있는 sample에 10x pre-mix buffer(100 mM KPO₄, pH 7.4, 1.5 M NaCl, 10% Triton)와 [³H] folic acid(20,000 cpm/assay)를 섞어서 최종 volume이 1 ml가 되게 H₂O로 희석하고 37°C에서 30분간 반응시켰다. 그 반응액에 500 µl의 dextrans coated charcoal을 넣어서 잘 혼합하여 얼음 위에서 10분간 방치하고 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 그 상등액을 scintillation counter에서 측정하였다.

8. Western Blot Analysis

Human folate receptor type γ 가 안정되게 발현되고 있는 CHO 세포주(CHO/hFR γ)를 serum free medium인 CHO-SFM-II에서 3일간 배양하고 그 배양액 및 세포 추출액으로부터 얻어진 단백질(50 µg)은 12.5% SDS-PAGE gel에서 분리하고 Immobilon-P membrane (Millipore)에 옮겼다. 그 blot는 human folic acid receptor type α 에 대한 polyclonal antiserum과 반응시키고 ECL Western blot analysis system(Amersham)을 이용하여 분석하였다.

9. Folic Acid Transport Assay

세포는 ice-cold pH 4.5 saline(3 ml)으로 2회 세척하고 ice-cold PBS(pH 7.4)로 2회 세척하였다. [³H] folic acid의 internalization을 조사하기 위하여 2 ml의 prewarmed DMEM(without FCS, 50 µg/ml BSA, 2µM [³H] folic acid)으로 5% CO₂ incubator에서 30분간 배양하였다. 특이적인 [³H] folic acid의 internalization(pmol/mg protein)을 결정하기 위하여 과도한 양의 cold folic acid(500배)의 존재하에서도 병행하여 실시하였다. 배

양 후에 세포들은 ice-cold PBS(pH 7.4)로 2회 세척하고 세포들은 PBS(1% Triton X-100, 20 mM EDTA, 0.3% PMSF)로 가용화하고 15,000 rpm에서 원심분리하여 상등액은 scintillation counter에서 측정하였다.

10. Cell Growth Rate

CHO/hFR γ , CHO/hFR α 그리고 CHO/Vector세포주는 6 well plate에 1×10^4 cells/well이 되게 하여 저농도의 folic acid DMEM(without folic acid, 10% FCS)에서 배양하고 1주일 간격으로 cells의 성장양상을 촬영하고 cells들은 trypsin으로 처리하여 회수하고 그 수를 계산하여 성장률을 결정하였다.

III. 결과 및 고찰

CHO cells에 transfection하여 human folic acid receptor의 type γ 의 cDNA는 human의 thymus cDNA library로부터 PCR을 시행하여 cloning하고 mammalian expression vector인 pcDNA3 vector에 subcloning하여 pcDhFR γ plasmid를 제작하였다. 이 pcDhFR γ plasmid를 CHO cells에 transfection하여 200 µg/ml G418의 농도에서 출발하여 서서히 그 농도를 높여서 1,000 µg/ml G418에서 내성을 보이는 colony들을 선택하여 Northern blot 분석에 의하여 hFR type γ 에 대한 mRNA가 강하게 발현되고 있는 clone을 cloning하였다. 그들 중에서 가장 강하게 발현하고 있는 세포주들을 선택하여 세포 배양액과 추출액을 준비하여 polyclonal rabbit anti-human folate receptor antiserum으로 Western blot 분석에 의하여 CHO cells에서 발현하고 있는 hFR type γ 는 세포 추출액에서 분자량이 약 30-kDa 정도의 band를 확인할 수 있었다. 그러나 배양액중에서는 32-kDa 부근에서 넓은 bands들이 나타났다(Fig. 1, A). 이와 같은 넓은 bands들은 아마도 이 단백질은 N-glycosylation site가 한군데 존재하기 때문에 N-glycosylation의 heterogeneity에 의한 것으로 추정되기 때문에 배양액 중으로 분비된 단백질을 endoglycosidase F로 처리하였다. Fig. 1의 B에서 보여주는 바와 같이 endoglycosidase F를 처리하지 않은 30-kDa와 32-kDa의 bands가 약 28-kDa의 band로 이동되는 것을 확인할 수 있었기 때문에 전기영동에서 얻어진 hFR type γ 의 넓은 bands들은 N-glycosylation의 heterogeneity에 의한 것으로 확인되었다(Fig. 1, B). 따라서 얻어진 세포주는 hFR type γ 를 강하게 발현하고 있기 때문에 이 세포주를 CHO/hFR γ 로 정하고 이 세포주를 이용하여

hFR type γ 에 대한 folic acid에 대한 binding 및 transport 능력을 조사하였다. 먼저 cell surface에 존재하는 folic acid receptors의 binding assay를 실시하였다. 먼저 세포 표면에 존재하는 hFR type γ 의 binding

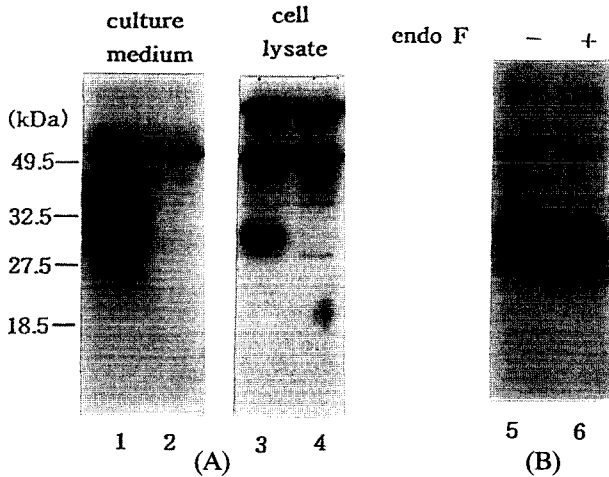


Fig. 1. Western Blot analysis. (A) The culture medium and cell lysate (50 μ g protein) of the stable transfectants (CHO/vector; lanes 2, 4, CHO/hFR γ ; lanes 1, 3) resolved on a 12.5% SDS-PAGE reducing gel and transferred electrophoretically to Immobilon-P membrane, and the blot was probed with polyclonal rabbit anti-human folate receptor antiserum. (B) The culture media (CHO/hFR γ) was treated with endo F and resolved in 12.5% SDS-PAGE, and the autoradiogram is shown.

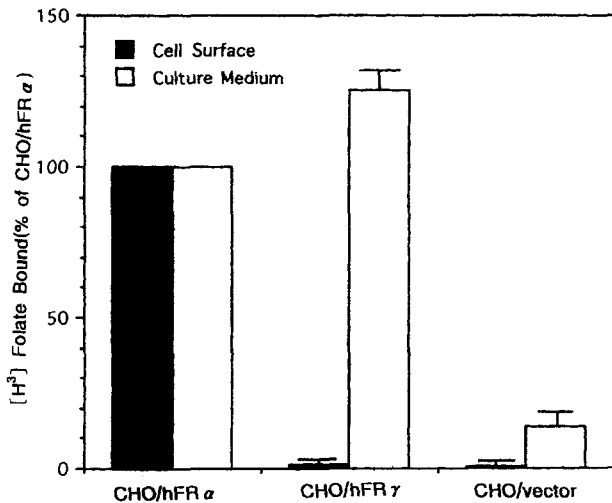


Fig. 2. Determination of cell surface and media folate binding. CHO cell culture media (CHO/hFR α , CHO/hFR γ and CHO/vector) were dialyzed twice against 1 liter each of pH 4.5 saline and twice against 1 liter each of PBS. Then 20 μ g protein used for [^3H]-folic acid total binding assay. CHO cells from each clone were incubated in 35 mm plates in DMEM containing 10% FCS, PSF, and 200 μ g/ml G418. After dissociating surface-bound folates from cell surface folate receptor with acid saline, cells incubated with ^3H -folic acid for 10 min at 4 $^{\circ}$ C with or without excess cold ligand. Aliquots of solubilized cells were counted and the results are expressed as cell surface binding relative to that observed in CHO/hFR α cells.

능력을 조사하였다. Cell surface binding assay에서는 human folate receptor의 다른 isoform인 hFR type α 와는 다르게 hFR type γ 에서는 아무런 binding activity도 존재하지 않았다. 그러나 배양액 중에서는 hFR type γ 는 hFR type α 보다도 약 1.25배 정도 강한 binding activity를 보였다(Fig. 2). 이와 같은 결과로 보아 hFR type γ 는 CHO cells에서 강하게 발현되고 있으나 cell surface에는 존재하지 않고 오로지 배양액 중으로 분비

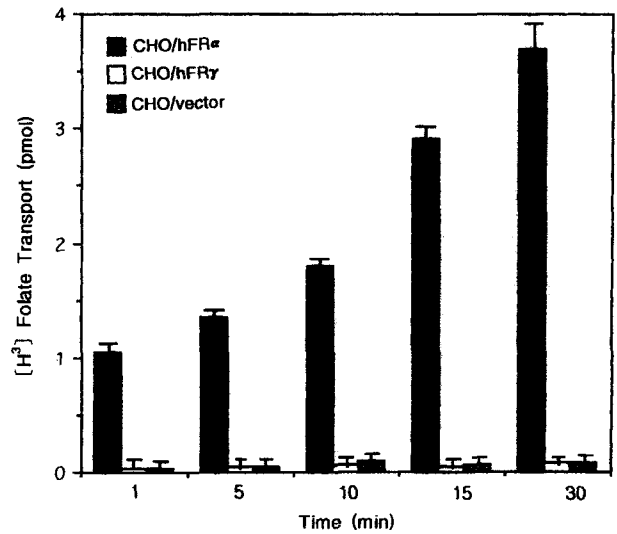


Fig. 3. Determination of [^3H]-folic acid transport. CHO cells from each clone were incubated in DMEM containing 10% FCS, PSF, and 200 μ g/ml G418. After dissociating surface-bound folates from cell surface receptor with acid saline, cells allowed to internalize [^3H]-folic acid for 1, 5, 10, 15, 30 min at 37 $^{\circ}$ C. Aliquots of solubilized cells were counted and the results are expressed as a [^3H]-folic acid transport (pmol).

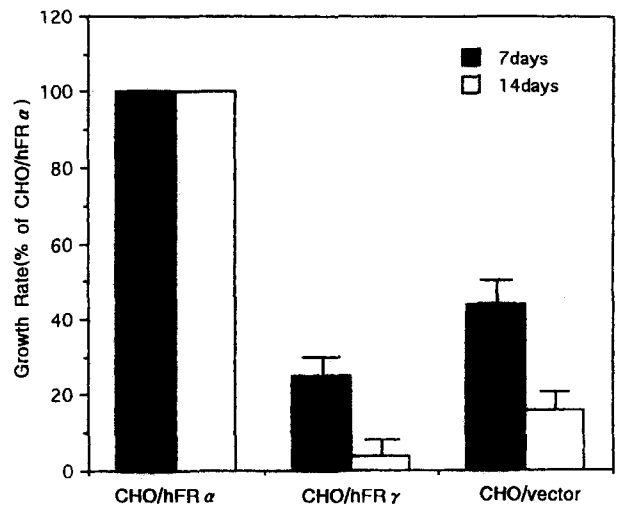


Fig. 4. Growth rate. Stable transfectants (CHO/hFR α , CHO/hFR γ and CHO/vector) were seeded in 6 well plate 10,000 cells/3 ml DMEM containing 1% (v/v) FCS, PSF, 250 μ g/ml G418, resulting in a final folic acid concentration of approximately 1 mM.

되는 것을 확인 할 수 있었다. 한편 hFR type γ 의 배양액중의 분비양상을 조사하기 위하여 hFR type α 와의 time course를 비교한 결과 hFR type α 는 배양액중으로 서서히 분비되지만 hFR type γ 는 약 3시간 정도의 배양으로 hFR type α 의 약 48시간의 배양에 해당하는 folic acid binding activity를 나타내었다(data not shown). 따라서 hFR type γ 는 세포내에서 생합성과 동시에 다른 분비 단백질처럼 배양액중으로 분비되는 것으로 여겨진다. 이런 결과들로부터 CHO cells에서 생산된 hFR type γ 는 hFR type α 와 β 에 비교하여 C-말단 부위의 소수성 아미노산이 짧기 때문에 GPI에 anchor 되지 않고 생합성되어 배양액 중에 분비되는 soluble

type의 hFR인 것으로 추정하였던 결과와 일치하였다 (Shen *et al.*, 1994). 일반적으로 GPI-anchored protein들은 GPI-anchoring을 위해서 5~19개의 hydrophilic spacer sequence가 존재하고 계속해서 8~31개의 hydrophobic region이 존재하는 것으로 알려져 있다(Furukawa *et al.*, 1997). 그러나 hFR type α 에서는 8개, hFR type β 에서는 11개, 그리고 hFR type γ 에서는 8개의 spacer sequence가 각각 존재하지만, 연속적으로 이어지는 hydrophobic amino acid잔기의 숫자가 크게 차이가 있다. hFR type α 와 hFR type β 는 각각 16개와 15개의 hydrophobic amino acid잔기가 존재하지만 hFR type γ 의 경우에는 겨우 4개만이 존재하고 있다. 특히 잠재

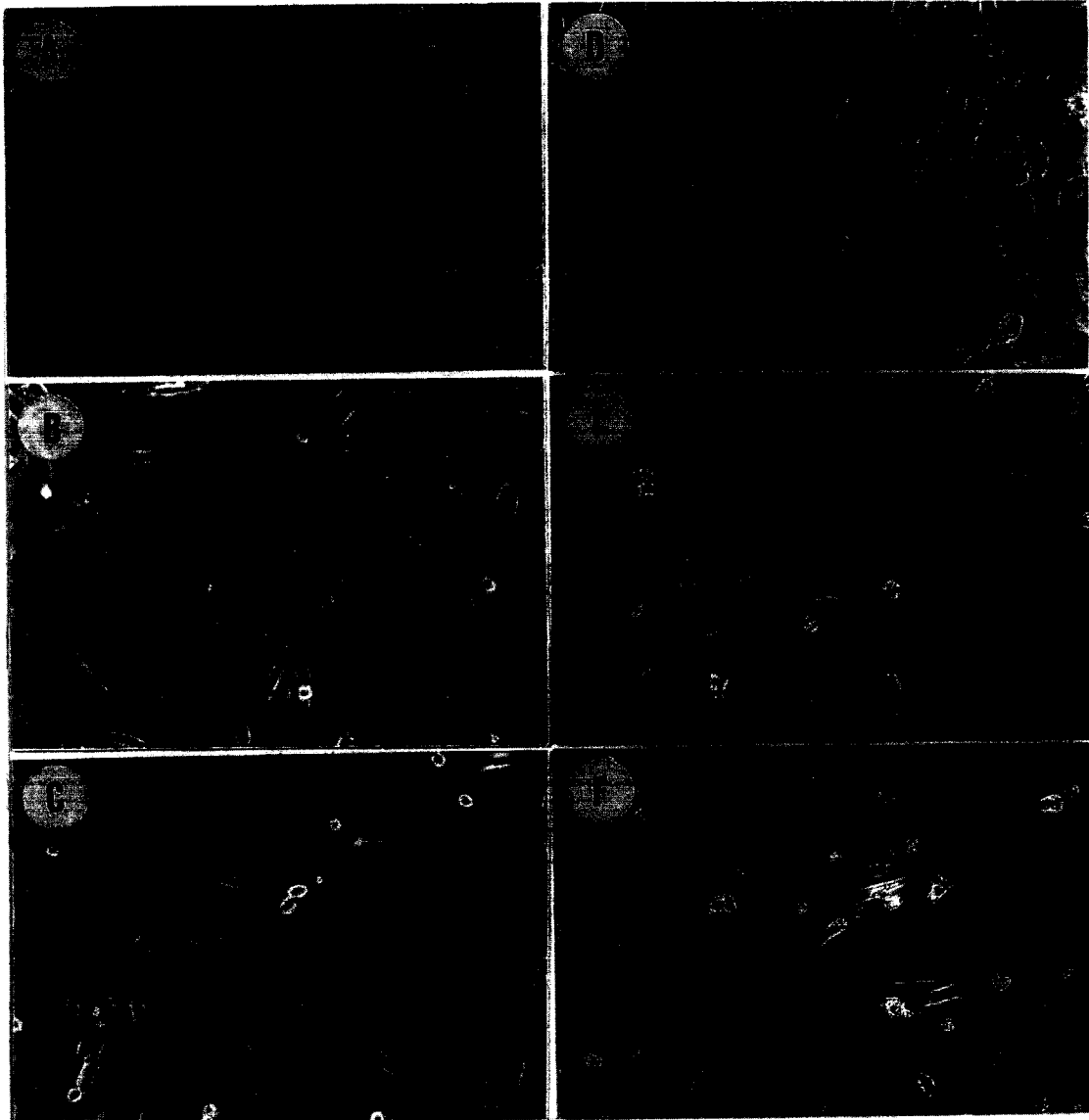


Fig. 5. Determination of Growth. CHO/hFR α (A, D) and CHO/hFR γ (C, F) stable clones and control cells (CHO/vector, B, E) were incubated in DMEM containing 1% (v/v) FCS. Photos of cells were taken at 7 (A, B and C) and 14 days (D, E, and F) after plating.

적으로 GPI transamidase의 활성화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 spacer sequence의 출발지점의 3개의 amino acid잔기(Asn-Ala-Gly)가 hFR type β 와 동일하게 hFR type γ 에서도 보존되어 있는 것으로 미루어 보아 hFR type γ 에서 나타나는 C-말단의 소수성 아미노산 잔기의 결여가 hFR type γ 가 GPI에 anchor되지 않고 분비되게 하는 결정적인 요인인 것으로 여겨진다. 이런 soluble type의 hFR type γ 가 folic acid를 binding 하지만 세포 표면에는 존재하지 않기 때문에 과연 이들의 기능이 무엇일까? 하는 의문이 제기되기 때문에 과연 이들이 세포내로 folic acid의 transport에 관여하는지를 알아보기 위하여 folic acid transport assay를 실시하였다. Fig. 3에서 보여주는 바와 같이 CHO/hFR α 는 incubation 시간의 상승과 더불어 세포내로 [H^3] folic acid의 transport 비율이 점진적으로 증가하였지만 CHO/hFR γ 는 CHO/vector의 control 세포와 동일하게 30분간의 incubation시켜도 [H^3] folic acid의 transport 비율의 변화가 일어나지 않았다. 따라서 CHO cells에서 생산된 hFR type γ 는 [H^3] folic acid와 결합은 할 수 있지만 세포내로의 수송능력은 없는 것으로 추정된다. 따라서 이 soluble type의 hFR γ 가 CHO cells의 성장에 어떤 영향을 미치는 가를 알아보기 위하여 저 농도의 folic acid 농도에서 각각 CHO/hFR γ , CHO/hFR α 그리고 CHO/vector cells들의 growth rate를 비교하였다. 각 세포들은 6 well plate에 1×10^4 cells/well이 되게 하여 저 농도의 folic acid DMEM(without folic acid, 10% FCS)에서 배양하고 1주일 간격으로 trypsin으로 처리하여 회수하여 그 수를 결정하여 본 결과 Fig. 4에서 보는 바와 같이 1주일 후에는 CHO/hFR γ cells는 CHO/hFR α cells들에 비하여 약 25%, 그리고 CHO/vector cells는 약 44%정도의 성장률을 나타냈다. 그러나 2주일 후에는 CHO/hFR γ cells는 약 4%, 그리고 CHO/vector cells는 약 16% 정도의 성장률을 나타내 CHO/hFR γ cells는 CHO/vector cells 보다도 더 낮은 성장률을 보였다(Figs. 4, 5). 이와 같은 낮은 성장률은 아마도 soluble type의 hFR γ 가 배양액중으로 분비되어 folic acid를 binding한 채로 존재하고 있기 때문에 세포가 이용할 수 있는 유리 folic acid의 양이 감소에 기인하는 것으로 보여진다. 따라서 C-말단부위의 소수성 아미노산 잔기의 결여로 인하여 세포 배양액중으로 분비되는 soluble type의 human folate receptor는 folic acid를 결합할 수는 있지만 세포내로의 folic acid 수송에는 관여하지 않는 것으로 나타났지만 hematopoietic 조직들에서 아주 특이적으로 발현되고 있는 것으로 알려져 있기 때문에(Shen *et al.*, 1994) 그 기능이 무엇인가 하

는 문제는 대단히 흥미있는 일이다. 따라서 본 연구실에서는 이런 문제들을 해결하기 위하여 연구를 진행 중이다.

감사의 말씀

이 논문은 '98학년도 원광대학교 교비지원에 의하여 이루어진 것이며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Antony, A.C., Briddell, R.A., Brandt, J.E., Straneva, J.E., Verma, R.S., Miller, M.E., Kalasinski, L.A. and Hoffman, R. (1991): Megaloblastic hematopoiesis in vitro: interaction of anti-folate receptor antibodies with hematopoietic progenitor cells leads to a cell proliferative response independent of megaloblastic changes. *J. Clin. Invest.*, **87**, 313-325.
- Capbell, I.G., Jones, T.A., Foukes, W.D., Trowsdale, J. (1991): Folate-binding protein is a marker for ovarian cancer. *Cancer Res.*, **51**, 5329-5338.
- Chung, K.-N., Saikawa, Y., Paik, T.-H., Dixon, K.H., Mulligan, T., Cowan, K.H., Elwood, P.C. (1993): Stable transfectants of human MCF-7 breast cancer cells with increased level of the human folate receptor exhibit an increased sensitivity to antifolates. *J. Clin. Invest.*, **91**, 1289-1294.
- Coney, L.R., Tomassetti, A., Carayannopoulos, L., Frasca, V., Kamen, B. A., Colanghi, M.I. and Zuraisski, V.R. (1991): Cloning of a tumor-associated antigen: MOv18 & MOv19 antibodies recognize a folate-binding protein. *Cancer Res.*, **51**, 6125-6132.
- Elwood, P.C. (1989): Molecular cloning and characterization of the human folate-binding protein cDNA from placenta and malignant tissue culture (KB) cells. *J. Biol. Chem.*, **264**, 14893-14901
- Elwood, P.C., Kane, M.A., Portillo, R.M. and Kolhouse, J.F. (1986): The isolation, characterization, and comparison of the membrane-associated and soluble folate-binding protein from KB cells. *J. Biol. Chem.*, **261**, 15416-15423.
- Furukawa, Y., Tsukamoto, K. and Ikezawa, H. (1997): Mutational analysis of the C-terminal signal peptide of bovine liver 5'-nucleotidase for GPI anchoring; a study on the significance of the hydrophilic spacer region. *Biochem. Biophys. Acta*, **1328**, 185-196.
- Jansen, G., Schonagel, J.H., Westerhof, G.R.,

- Rijksen, G., Newell, D.R. and Jackman, A.L. (1990): Multiple membrane transport systems for the uptake of folate-based thymidylate synthase inhibitors. *Cancer Res.*, **50**, 7544-7548.
- Lacey, S.W., Sanders, J.M., Rothberg, K.G.B., Anderson R.G.W. and Kamen, B.A. (1989): Complementary DNA for the folate binding protein correctly predicts anchoring to the membrane by glycosyl-phosphatidylinositol. *J. Clin. Invest.*, **84**, 715-720.
- Luhurs, C.A., Raskin, C.A., Durbin, R., Wu, B., Sadasivan, E., McAllister, W. and Rothenberg, S. P. (1992): Transfection of a glycosylated phosphatidylinositol-anchored folate binding protein complementary DNA provides cells with the ability to survive in low folate medium. *J. Clin. Invest.*, **90**, 840-847.
- Matsue, H., Rothberg, K.B., Takashima, A., Kamen, B.A., Anderson, R.G. W. and Lacey, S.W. (1992): The folate receptor allows cells to grow in low concentrations of 5-methyltetrahydrofolate. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **89**, 6006-6009.
- Ratnam, M., Marquardt, H., Duhring, J.L. and Freisheim, J.H. (1989): Homologous membrane folate binding proteins in human placenta: cloning and sequence of a cDNA. *Biochemistry*, **28**, 8249-8254.
- Ross, J.F., Chaudhuri, P.K. and Ratnam, M. (1994): Differential regulation of folate receptor isoforms in normal and malignant tissues in vivo and in established cell lines. *Cancer*, **73**, 2432-2443.
- Sadasivan, E. and Rothenberg, S.P (1989): The complete amino acid sequence of a human folate binding protein from KB cells determined from the cDNA. *J. Biol. Chem.*, **264**, 5806-5811.
- Shen, F., Ross, J.F., Wang, X. and Ratnam, M. (1994): Identification of novel folate receptor, a truncated receptor type β in hematopoietic Cells: cDNA cloning, expression, immunoreactivity, and tissue specificity. *Biochemistry*, **33**, 1209-1215.
- Shen, F., Wu, M., Ross, J.F., Miller, D. and Ratnam, M. (1995): Folate receptor type γ is primarily a secretory protein due to lack of an efficient signal for glycosylphosphatidylinositol modification: Protein characterization and cell type specificity. *Biochemistry*, **34**, 5660-5665.
- Westerhof, G.R., Jansen, G., van Emmerik, N., Kathmann, I., Rijksen, G., Jackman, A.L. and Schronagel, J.H. (1991): Membrane transport of natural folates and antifolate compounds in murine L1210 leukemia cells: role of carrier- and receptor-mediated transport systems. *Cancer Res.*, **51**, 5507-5513.