Zoological Studies

Molecular Characterization of Major Histocompatibility Complex Class II *DQB* and *DRB* Genes in Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus* and *T. aduncus*) from the Western Pacific

Wei-Cheng Yang, Lien-Siang Chou, and Jer-Ming Hu*

Institute of Ecology and Evolutionary Biology, National Taiwan University, 1 Roosevelt Rd., Sec. 4, Taipei 106, Taiwan

(Accepted June 27, 2007)

Wei-Cheng Yang, Jer-Ming Hu, and Lien-Siang Chou (2007) Molecular characterization of major histocompatibility complex class II DQB and DRB genes in bottlenose dolphins (Tursiops truncatus and T. aduncus) from the western Pacific. Zoological Studies 46(6): 664-679. Variability of the major histocompatibility complex is very suitable for investigating a wide range of open questions in evolutionary ecology and conservation because it reflects evolutionarily relevant and adaptive processes within and between populations. Herein, we present the first full-length expressed DQB and DRB gene products in the order Cetacea from 2 species of bottlenose dolphins (genus Tursiops, family Delphinidae) of the western Pacific that differ in their diet, microflora, and habitat. These species might represent a natural model through which we can examine the immunogenetic consequences of different pathogenic and environmental influences on the MHC of mammals. Blood samples from 2 T. aduncus (from Taiwan and Indonesia) and 2 T. truncatus (from Taiwan and Japan) were used for RACE-PCR. The presence of 1 DQB locus and 2 DRB loci in this genus was revealed. The presence of Tutr-DQB, Tuad-DRB, and Tutr-DRB suggests a functional role for these molecules in pathogen-specific immune responses. However, several features do not support a traditional role for Tuad-DQB molecules in peptide binding, and further study is needed. The phylogenetic analysis revealed that the sequence divergence of these 2 species might reflect different selective pressures between pathogens in oceanic (T. truncatus) and coastal (T. aduncus) waters. This study provides an essential foundation for analyzing variations in MHC genes and studying infectious disease ecology in bottlenose dolphins. http://zoolstud.sinica.edu.tw/Journals/46.6/664.pdf

Key words: Major histocompatibility complex, Bottlenose dolphins, Tursiops.

he risk of exposure to novel pathogens in marine species has become elevated from changes in chemical and microbial environments due to anthropogenic intrusion (de Swart et al. 1996), as emerging infectious diseases in marine environments are becoming more widely recognized (Harvell et al. 1999). Therefore, studies on the genetics of functionally important immunological genes such as those of the major histocompatibility complex (MHC) are important in marine organisms. The MHC is comprised of a family of highly polymorphic genes encoding a set of transmembrane proteins that are critical for generating immune responses (Kennedy et al. 2002).

Maintaining genetic diversity of the MHC thus plays an important role in responding to rapidly evolving infectious agents that periodically afflict natural populations (Klein and Sato 1998). This diversity is thought to be maintained by balancing selection, a broad term that identifies any kind of natural selection in which no single allele is absolutely most fit (Hughes and Yeager 1998, Meyer and Thomson 2001). Exactly how much MHC diversity is required to ensure long-term population viability remains a fundamental question in conservation genetics (Miller and Lambert 2004). It is claimed that a lack of variation in the MHC may increase the susceptibility of a population to

^{*}To whom correspondence and reprint requests should be addressed. Tel: 886-2-33662472. Fax: 886-2-33662473. E-mail:jmhu@ntu.edu.tw. Jer-Ming Hu and Lien-Siang Chou contributed equally to this work.

infectious disease epidemics, with potentially catastrophic consequences (Yuhki and O'Brien 1990, Bontrop and Watkins 2005). For example, a link between MHC diversity and an effective response to both pathogenic and toxicogenic challenges was proposed (Acevedo-Whitehouse et al. 2003). However, not all MHC genes show high diversity. The most diverse and extensively studied MHC genes are the DQB and DRB genes. Diversity of DQB or DRB genes has been characterized in many mammalian species including primates, mice, domestic mammals, and marine mammals (e.g., Schook and Lamont 1996, Yuhki and O'Brien 1997, Hughes and Yeager 1998, Mikko et al. 1999, Wagner et al. 1999, Bowen et al. 2004, Baker et al. 2006). After these studies on non-model freeranging species were carried out, intriguing guestions were raised about whether and how selection operates on the MHC of natural populations characterized by distinct pathogens and demographic and environmental conditions (Bernatchez and Landry 2003, Sommer 2005). In this study, we selected the DQB and DRB genes in bottlenose dolphins (of the genus Tursiops) in order to expand our understanding of how different environments influence MHC evolution in marine mammals.

Tursiops is of particular interest because it is the most common and well-known dolphin genus, but data on abundances and distributions are still far from complete and validated, and the IUCN lists this genus as data deficient in their Red List of Endangered Species (IUCN 2006). Bottlenose dolphins occur in all tropical and temperate waters, including littoral zones, inshore lagoons, estuaries, and bays, as well as the offshore realm (Reeves et al. 2003). In the northwestern Atlantic, there are at least 2 ecotypes of T. truncatus (Montagu 1812) (coastal and offshore) that differ in distribution, morphology, hemoglobin profiles, parasitology, and diet (Leatherwood and Reeves 1990). Similarly, 2 morphotypes of Tursiops have been described in the western Pacific. Several studies have suggested that bottlenose dolphins existing in Chinese waters are 2 separate species (Wang et al. 1999 2000a b, Perrin and Brownell 2001). The larger form generally found in deep, offshore waters was described as T. truncatus. The smaller form, which inhabits shallow, tropical, coastal waters is generally known as T. aduncus (Ehrenberg 1832, Yang 1976, Zhou and Qian 1985, Gao et al. 1995). Because shallow waters along the coast are influenced by terrestrial runoff, the diversity and abundance of pathogens in the coastal waters likely differ from those in oceanic areas (Hayashi et al.

2006). It would be interesting to investigate differences in selective forces from pathogens on immune genes between these 2 species whose diets and microflora presumably differ (Wang 2003). This provides a natural model for examining the immunogenetic consequences of different pathogenic and environmental influences on the MHC of marine mammals. This is the 1st study characterizing the full-length *DQB* and *DRB* gene sequences in the order Cetacea, which is an important foundation for future investigations on the evolutionary ecology of MHC genes and studies of the population health of bottlenose dolphins.

MATERIALS AND METHODS

Blood samples from 2 individuals of each species (Tt: T. truncatus and Ta: T. aduncus) from Taiwan (Tt1: a stranded case and Ta1: an individual kept in Hong Kong Ocean Park, Hong Kong), Japan (Tt2: kept in Hualien Ocean Park, Taiwan), and Indonesia (Ta2: kept in Hong Kong Ocean Park, Hong Kong) were directly collected into PAXgene Blood RNA tubes (QIAGEN, Valencia, CA, USA) for RNA isolation. RNA was isolated by silica-based gel membranes supplied in the PAXgene Blood RNA kit. RNA from the 2 animals of the same species was pooled into a single sample and used as a template for cDNA synthesis. The cDNA library construction, 5' and 3' gene transcript amplifications of the DQB and DRB genes, amplicon visualization, cloning, and sequencing were performed using the procedures described in Bowen et al. (2002 2004). The nucleotide sequences of the amplicons were compared using MEGA vers. 3.0 (Kumar et al. 2004). For each of the DRB and DQB gene products, regions with sequence homology were identified and used to design bottlenose dolphin MHC-specific oligonucleotides (Table 1), which were used to amplify fulllength DQB and DRB gene transcripts from the pooled RNA-derived complementary (c)DNA fragments. Gene product amplification reactions contained both TtDQBFL1/TaDQBFL1 and TtDQBFL2/TaDQBFL2 (for DQB gene products) or TtDRBFL1/TaDRBFL1 and TtDRBFL2/TaDRBFL2 (for DRB gene products). RACE-PCR, amplicon visualization, cloning, and sequencing were performed using the same procedures mentioned above. Multiple clones were sequenced to maximize the identification of all sequences present in the 2 animals examined. Furthermore, these sequences were confirmed by performing 2 independent PCRs, by examining multiple clones, and by sequencing each clone in both directions, in compliance with human lymphocyte antigen (HLA) nomenclature rules (Marsh et al. 2005). The nucleotide sequences of the RACE products were analyzed using MEGA vers. 3.0 and compared with known sequences using the NCBI BLAST program (Altschul et al. 1990). Synonymous and nonsynonymous divergences (d_s and d_N) and standard errors were calculated using the Jukes and Cantor correction of Nei and Gojobori (Nei and Gojobori 1986). Sequences of DRB and DQB genes from human, cattle, and sea lion were selected, along with those identified in this study, for phylogenetic analyses. The nucleotide sequences obtained were aligned with other related mammalian MHC sequences using the CLUSTAL W method (Thompson et al. 1994) taking into account the deduced amino acid sequences. We followed Bowen et al. (2002, 2004) in identifying each exon. Phylogenetic analysis was carried out using the Neighbor-joining (NJ) method implemented in MEGA 3.0 with Kimura's 2-parameter model, and support for nodes was evaluated by 5000 bootstrap replications. Furthermore, since exon 2 includes the peptide-binding region (PBR) which usually shows much higher levels of genetic variation than other exons (Schook and Lamont 1996), we conducted 3 different datasets for tree reconstruction and comparison: full-length, only exon 2, and only exon 3-6 sequences. HLA-DPB1 was used as the outgroup in all analyses.

RESULTS

Characterization of bottlenose dolphin *DQB* and *DRB* cDNA clones

We obtained clones containing full-length bottlenose dolphin DQB and DRB sequences from the RACE cDNA products of 2 T. truncatus and 2 T. aduncus individuals. The nucleotide and deduced amino acid sequences of the 780- (DQBprimer derived) and 801 bp (DRB-primer derived) products were typical of transcripts from mammalian class II genes. These transcripts were characterized as Tutr-DQB, Tuad-DQB, Tutr-DRB, and Tuad-DRB based on alignments with DQB and DRB sequences of HLA, bovine lymphocyte antigen (BLA), and California sea lion lymphocyte antigen (GenBank accession nos.: HLA-DRB1, AY961074; BLA-DRB3, NM 001012680; Zaca-DRB, AY491464; HLA-DQB1, NM 002123; BLA-DQB, Y18202; and Zaca-DQB, AF503406) (Fig. 1). Furthermore, we verified that the nucleotides encoding amino acids 196 and 201 (threonine and aspartate, respectively) within exon 3 could be used to distinguish DQB from DRB products in bottlenose dolphins by following previous studies (Bowen et al. 2002, Robinson et al. 2003) (Figs. 1, 2). The longest bottlenose dolphin DQB and DRB gene products encoded molecules of 259 and 266 amino acids (aa), respectively (Fig. 2). $DQ\beta$ molecules consisted of a 36-aa leader sequence, a 90-aa β 1 domain, a 94-aa β 2 domain, a 37-aa transmembrane domain, and a 2-aa cytoplasmic domain. DR β sequences consisted of a 29-aa leader sequence, a 95-aa β 1 domain, a 103-aa β 2

Name	Primer sequence	Specificity	Amplicon
DQB-U172 ^a	CYGAGGGCAGAGACTCKCC	Mammalian DQB	597 bp; exons 1-4
DQB-L769 ^a	CTCTGGGMAGATTCAGACTG		
DRB-U182 ^a	CGGGACSGAGCGGGTKC	Mammalian DRB	512 bp; exons 2-4
DRB-L729	CACTCAKCATCTTGCTCTG		
TtDQBFL1	ATGTCTGGGACGGTGGCTCT	T. truncatus DQB	797 bp; 5' exon 1-3'UTR
TtDQBFL2	TCCCCGTCAAAGCGTCCTCA		
TaDQBFL1	CTGGGTGTGAGCTGTGTTCACT	T. aduncus DQB	852 bp; 5'UTR-3'UTR
TaDQBFL2	TGAGGACGCTTTGACGGGGA		
TtDRBFL1	TTGCCTGCTCCCCTCACAGC	T. truncatus DRB	997 bp; 5'UTR-3'UTR
TtDRBFL2	GTCAAGGGGCAGGGGCTGAG		
TaDRBFL1	GGCTCCTGGATGGCAGCTCTGA	T. aduncus DRB	1001 bp; 5'UTR-3'UTR
TaDRBFL2	AAGGGGCAGGGGCTGAGGAA		

^aFrom Bowen et al. 2002 2004.

Yang et al. - DQB and DRB Genes in Bottlenose Dolphins

	↓ E:	kon1		4 4 4	1 1 1	1 1 1	100	000	000	000	200	200	200	111	111	1 4 4	155	5 E E	555	550	666	666	666	777	777
Tutr-DRB*01 Tutr-DRB*02 Tutr-DRB*03	123	456	789	012 ATG	111 345 GTG	678 TCC	122 901 CTG	222 234 TAT	222 567 TTC	223 890 TCC	333 123 AGA 	333 456 GGC	333 789 TCC	444 012 TGG	444 345 ATG	444 678 GCA	455 901 GCT	555 234 CTG	555 567 ACA	556 890 GTG	666 123 ATA	666 456 CTG	666 789 ATG	012 GTG	345 CTG
Tutr-DRB*04 Tutr-DRB*05 Tutr-DRB*06 Tutr-DRB*07	 			 	 	 	 	 	· · · ·	 	G G G	 	· · · · · · · ·	 	 	T T T G	 	· · · ·	· · · ·	· · · · · · · ·	· · · ·	· · · · · · · ·	· · · · · · · ·	· · · ·	· · · · · · · ·
Tuad-DRB*01 Tuad-DRB*02 Tuad-DRB*03 Tuad-DRB*04 Tuad-DRB*05				· · · · · · ·	· · · · · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · · · · ·	G G G G	· · · · · · ·	· · · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · · · · ·	· · · · · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · · · · ·	· · · · · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · · ·
Tuad-DRB*06 Tuad-DRB*07 BLA-DRB3 HLA-DRB1	 	 	 	· · · · · · · ·	· · · · · · · · · · ·	 .G.		 A . G	· · · · · · · ·	 T C.T	G G G G	· · · · · · · ·		 C	· · · · · · · · · · ·		· · · · · · · ·	· · · · · · · ·	 .т.	· · · · · · · · · · ·	 G C .	· · · · · · · ·	· · · · · · · ·	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	· · · · · · · · · · ·
Zaca-DRB Tuad-DQB*01 Tuad-DQB*02 Tuad-DQB*03	ATG ATG ATG	TCT TCT TCT	GGG GGG GGG	 . C . . C .	C 	. G T G . T G . T G . T	· · · ·	.G. C.G C.G C.G	A A A	CTT C C C	G 	· · · · · · · ·	ĊŤŤ CTT CTT	· · · · · · · ·	. CA . CA . CA	A A A A	 	T G G G	. TG . TG . TG . TG	T 	G G G	· · · · · · · · · · ·	 . C . . C . . C .	· · · ·	
Tutr-DQB*02 Tutr-DQB*02 Tutr-DQB*03 Zaca-DQB HLA-DQB1	ATG ATG ATG ATG	TCT TCT TCT	GGG GGG TGG	. C . . C . . C . . A A	 A A A .	G . T G . T G . T G . T G . T	A A A A 	C.G C.G CGG CGG	A A A A	C C C C	 G	· · · · · · · · · · ·	CTT CTT CT. CTT	 C	. CA . CA . CA . CA GCA	A A A 	 A	G G G A A G	. TG . TG . TG . TG	 A T	G G C G	· · · · · · · · · · ·	. C . . C . G T C .	 A	· · · · · · · ·
BLA-DQB	ATG	TTT	GGG			G . T		CGG	A	C	111	.C. ↓E 111	CT. Exon: 111	 2 111	.CA	111	.T.	G	. TG	111	. CC	111	G	A	
Tutr-DRB*01 Tutr-DRB*02 Tutr-DRB*03	678 AGC	901 CCG	234 CCC	567 CTC	890 TCT	999 123 TGG	456 GCC	9999 789 AGG	012 GAG	345 ACC	678 CCA	901 TCA	234 CTT	567 TTC	890 ATG	123 AAT	456 CAG	789 TTT	012 AAG	345 TCC	678 TAC	901 TGT	234 CAC	567 TTC	890 TCT
Tutr-DRB*04 Tutr-DRB*05 Tutr-DRB*06 Tutr-DRB*07	· · · · · · · · · · ·	T T T		· · · · · · · · · · ·	G G G		· · · · · · · · · · ·	· · · · · · · · · · ·	· · · · · · · ·	· · · · · · · · · · ·	· · · · · · · ·	· · · · · · · ·		· · · · · · · ·	· · · · · · · · · · ·	Т Т Т	· · · · · · · · · · ·	· · · · · · · · · ·	· · · · · · · ·	ĞĞ. GG. GG.	G . G G . G G . G	· · · · · · · · · ·	T T T	· · · · · · ·	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
Tuad-DRB*01 Tuad-DRB*02 Tuad-DRB*03 Tuad-DRB*04 Tuad-DRB*04	· · · · · · · ·	· · · · · · · · · · ·	· · · ·	· · · · · · · ·	G G G G	· · · · · · ·	 A A	· · · · · · ·	· · · · · · · ·	· · · · · · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · · ·	 . G .	· · · · · · · ·	· · · · · · · · · ·	Т 	 	A 	· · · ·	G G G	G . G G . G G . G G . G	· · · · · · ·	T T T T	· · · · · · ·	
Tuad-DRB*06 Tuad-DRB*06 Tuad-DRB*07 BLA-DRB3 HLA-DRB1	 T	· · · · · · · · · · T T C	· · · · · · · · · · · A	 G G	G G G . C G	· · · · · · · · · ·	· · · · · · · · · ·	 	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	 	 . A . G	 C	 . A . G	· · · · · · · ·	 C T	Т., G.G.G.G.	 т.т	A A . A . G	· · · · · · · · · · · A	G G GG. CAT	G.G G.G G.G	· · · · · · · ·	T T T	· · · · · · · ·	
Zaca-DRB Tuad-DQB*01 Tuad-DQB*02 Tuad-DQB*03		A . C A . C A . C A . C	A A A	T.G GAG GAG GAG	G G G G	GA. GA. GA.	T . G . . G . . G .	A A A	C C C	Т.Т Т.Т Т.Т		C.T CAG CAG CAG	. A . G A . G A . G A .		Т Т Т Т	G . G T . C T . C T . C	. T . . G T . G T . G T	G CA. CA. CA.	. T . . T . . T . . T .	GG. GG. GG. GG.	G.G ATG ATG ATG	· · · · · · ·	T T T T	. A T 	C A . C A . C A . C
Tutr-DQB*01 Tutr-DQB*02 Tutr-DQB*03 Zaca-DQB HLA-D0B1	· · · · · · · · · · ·	A.C A.C A.C ATC A C	A A A A	GAG GAG GAG G.G	G G G G	GA. GA. GA. GA.	.G. .G. .G.	A A A A	C C C C	T.T T.T T.T T.T T.T	· · · · · · C	CAG CAG CAG CAG	GA. GA. GA. GA.	· · · · · · ·	Т Т G G	. TC . TC TTC TTC TTC	.GT .GT .GT	C A . C A . C A . 	. T . . T . . T . . T .	GG. GG. .T. GG. GG.	ATG ATG ATG G.G ATG	· · · · · · · · · · C	T T T T T	· · · · · · · ·	A.C A.C A.C A.C A.C
BLA-DQB	111 555	A.C 111 555	111 555	ĞĠĞ 111 666	Ğ 111 666	GA. 111 666	.G. 111 677	111 777	111 777	T.A 111 778	111 888	AAG 111 888	GA. 111 888	111 999	G 111 999	ĠŤČ 111 999	122 900	222 000	.Ť. 222 000	GG. 222 001	C.G 222 111	222 111	T.T 222 111	222 222	A . C 222 222
Tutr-DRB*01 Tutr-DRB*02 Tutr-DRB*03	123 AAT	456 GGG 	789 ACA	012 GAG	345 CGG 	678 GTG	901 CGG 	234 TTC C	567 GTG 	890 GAG . TT	123 AAA 	456 CAC 	789 ACG . TC	012 TAT	345 AAC 	678 CGG 	901 GAG	234 GAG 	567 TAC	890 GTG	123 CGC 	456 TTC 	789 GAC	012 AGC	345 GAC
Tutr-DRB*04 Tutr-DRB*05 Tutr-DRB*06 Tutr-DRB*07	· · · · · · · ·	 	· · · ·	 	 	· · · ·	 	C C C	T T T	. TT . TT . TT	.G. .G. .G.	A A A	. TC . TC . TC	· · · · · · · ·	 	 	 	· · · · · · · ·	· · · ·	· · · · · · · ·	· · · · · · · ·	· · · · · · · ·	· · · · · · · ·	· · · · · · · ·	· · · · · · · ·
Tuad-DRB*01 Tuad-DRB*02 Tuad-DRB*03 Tuad-DRB*04	· · · · · · · ·	· · · · · · · ·	· · · ·	 . G .	· · · · · · · ·	· · · ·	· · · · · · · ·	. A . C C	т Т Т Т	. . . TT . TT . TT . <u>T</u> T	.G. .G. .G.	IG. G G G	. TC . TC . TC . TC	· · · · · · · ·	· · · · · · · ·	· · · ·	· · · · · · · ·	· · · · · · ·	ĊŤ.	· · · · · · · ·	· · · · · · ·	. A . . A . 	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · · ·
Tuad-DRB*05 Tuad-DRB*06 Tuad-DRB*07 BLA-DRB3	· · · · · · · · · · · C	· · · · · · · · · ·	· · · · · · · C	· · · · · · · · · ·	· · · · · · · · · ·	T 	· · · · · · · · · · ·	. A . 	т с	. T T . T T . T . C	. G . . G . . G .	ТС. С ТС. т	. †ċ	· · · · · · ·	 	 G.A	 A	· · · · · · ·	ĊŤ. .Ť.	· · · · · · · · · ·	· · · · · · ·	. A . 	· · · · · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · · · · ·
Zaca-DRB Tuad-DQB*01 Tuad-DQB*02 Tuad-DQB*03	C C C	· · · · · · C · · C	G G G	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	C C C	C 	. TC A A	. G . . G . . G . . G .	Т Т Т	. TC . TC . TC . TC	· · · · · · ·	· · · · · · ·		· · · · · · ·	· · · · · · ·	. U . . T . . T . . T .	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · · ·
Tutr-DQB*01 Tutr-DQB*02 Tutr-DQB*03 Zaca-DOB		C C C	G G G	· · · · · · ·	· · · · · · · ·			ĞĞ. GG. CA.	A A C	AGC AGC AGC	. G . . G . . G .	Т Т Т Т	. TC . TC . TC		T		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·			· · · · · · · ·		 . C .	 . G .		· · · · · · · ·
HLA-DQB1 BLA-DQB	Č C		G		C	•••	T 	C . T . A .		AĞČ ACC	.G. .G.	АĠ. Т	. T C . T C	Ċ		A . A .	A		АТ. 	. c .					

Fig. 1. (Cont.)

Zoological Studies 46(6): 664-679 (2007)

Tutr-C Tutr-C Tutr-C Tutr-C Tuad-C C Tuad-C C Tuad-C C Tuad-C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	Tutr-D	Tutr-C Tutr-C Tutr-C Tutr-C Tutr-C Tuad-C C Tuad-C C BLA-DC	Tutr - C Tutr - C Tutr - C Tutr - C Tutr - C Tutr - C Tuad - C	Tuta
>/1.6 >/1.7.7.6 >/1.7.7)RB*01)RB*02)RB * 01)RB * 02)RB * 03)RB * 05)RB * 05)RB * 07)RB * 02)RB * 02)RB * 03)RB * 03)RB * 04)RB * 02)RB * 03)RB * 02)RB * 02)QB * 02 (CB * 02 (CB * 02)QB * 02 (CB * 02 (CB * 02)QB * 02 (CB	PRB*01 PRB*02 PRB*04 PRB*05 PRB*06 PRB*07 PRB*07 PRB*08 PRB*08 PRB*09 PRB*01 PRB*02 PRB*03 PRB*04 PRB*05 PRB*06 PRB*07 PRB*08 PRB*01 PRB*02 PRB*03 PRB*02 PRB*02 PRB*02 PRB*02 PRB*02 PRB*03 PRB*02 PRB*03	
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	333 777 678 CGA	333 000 123 GAG 	GTG GTG TG TG	222 222 678
	↓ 333 788 901 GTG	333 000 456 CAG 	GGC GGC 	222 233 901
	Exor 333 888 234 GCA	$\begin{array}{c} 3 & 3 & 3 \\ 0 & 0 & 0 \\ 7 & 8 & 4 \\ . & . & . \\ . & . & . \\ . & . & . \\ . & . &$	GAG	222 333 234
	13 333 888 567 CCT	33112 0AG 	TAC C C C C C C C C T	222 333 567
G A .	333 889 890 ACA	333 111 345 GCC 	CGG	222 334 890
	333 999 123 GTG	$\begin{array}{c} 333\\111678\\GG.$	GCG C C	222 444 123
	333 999 456 ACT	333 122 901 6TG C C C C	436 G T G	222 444 456
	333 999 789 GTG	333 222 234 GAC	ACC 	222 444 789
	444 000 012 TAT	333 2225 567 ACG 	A A G G G G G G G G G G G G G G G G G G	222 555 012
	444 000 345 CCT	333 2230 TAC .T GTG GTG GTG GTG GTG GTG GTG GTG G	CTG	222 555 345
	444 000 678 GCA	333 333 123 TGC	G G G C G G C G G C G G C G G C G G G G G C G G G C G G C G G G C G G G C G G G G	222 555 678
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	444 011 901 AAG	333456 3336 456 46 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4		222 566 901
	444 111 234 ACA	3333 7899 CAC T T T T A	234 CCG 	222 666 234
	444 111 567 CAG	333 444 012 AAC	GAC GAC AT AT AT AT AT AT AC C	222 666 567
	444 112 890 CCC	333 444 345 TAC	GCC GCC 	222 667 890
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	444 222 123 CTG	3 3 3 4 4 4 6 7 8 G G G G 	GAG GAG AC. AC. AC. 	222 777 123
	444 222 456 CAG	333 455 901 	A.G. C	222 777 456
	444 222 789 CAC	33354 55523 6	TGG TGG	222 777 789
	444 333 012 CAC	333 555 6AG A A A A		222 888 012
	444 333 345 AAC	333 556 8900 AGC CC	A G C	222 888 345
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	444 333 678 CTC	333 666 123 TTC 		222 888 678
	444 344 901 CTG	333 6666 ACG .T. .T. .T. .T. .T. .T. .T.	AAG 	222 899 901
	444 444 234 GTC	333 666 789 GTG T T T T T T	GAC	222 999 234
C	444 444 567 TGC	333 777 012 CAG 	Social T T T T T T T T T T T T T A A A A A A	222 999 567
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	444 445 890 TCT	333 777 345 CGG 	CTG C	223 990 890

Fig. 1. (Cont.)

Tutr-DPP+01	444 555 123	444 555 456	444 555 789	444 666 012	444 666 345	444 666 678	444 677 901	444 777 234	444 777 567	444 778 890	444 888 123	444 888 456	444 888 789	444 999 012	444 999 345	444 999 678	455 900 901	555 000 234	555 000 567	555 001 890	555 111 123	555 111 456	555 111 789	555 222 012	555 222 345
Tutr-DRB*02 Tutr-DRB*03 Tutr-DRB*04		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·							· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·					· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·			· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·				· · · ·	· · · ·	· · · ·	· · · ·
Tutr-DRB*05 Tutr-DRB*06 Tutr-DRB*07	· · · · · · ·	· · · ·	· · · ·	· · · ·	· · · ·	· · · · · · ·	· · · ·	· · · ·	· · · · · · ·	· · · ·	· · · ·	· · · · · · ·	· · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · ·	· · · ·	· · · ·	· · · ·	 	· · · ·	· · · ·	· · · ·	· · · ·	· · · · · · · ·
Tuad-DRB*01 Tuad-DRB*02 Tuad-DRB*03 Tuad-DRB*04	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	G 	· · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·
Tuad-DRB*05 Tuad-DRB*06 Tuad-DRB*07	· · · · · · ·	· · · · · · ·		· · · · · · ·		· · · · · · ·			· · · · · · ·			· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·			· · · · · · ·		· · · · · · ·			G			· · · · · · ·
BLA-DRB3 HLA-DRB1 Zaca-DRB	· · · · · · ·	C	· · · ·	· · · · · · ·	C 	· · · · · ·	· · · ·	ÀG.	· · · · · · ·		· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	 †	· · · · · · ·	 Ţ	· · · ·	T 		· · · · · · ·	A	T A . T T	· · · ·	· · · · · · <u>Ç</u>	A G G
Tuad-DQB*01 Tuad-DQB*02 Tuad-DQB*03 Tutr-DQB*01	· · · · · ·	. CA . CA . CA	. A . . A . . A . A	· · · · · ·	· · · · · ·	· · · · · ·	· · · · · ·	G G	C C	A A A A	T T T	C C C	· · · · · · ·	· · · · · ·	· · · · · ·	T T T	. A . . A . . A . A	· · · · · · ·	G G	· · · · · ·	ACA ACA ACA	T T T	C C	T T T	G G G
Tutr-DQB*02 Tutr-DQB*03 Zaca-DQB		. C A . C A . C A	. A . . A . . A .		 	· · · · · · ·		G G G	C C C	A A A	T T T	C C C	· · · · · · ·	 		T T T	. A . . A . . A .		G G G		ACA ACA AGA	T T T	C C T	T T C	G G G
HLA-DQB1 BLA-DQB	 	. CA . CG	. A . . A . 555	 	 	G	.C. 	G G	C C	A A.G	 T	C C	 	T	 	T T	. A . . A . 555	 .G.	G G	 	ACA ACA 555	T C	C C	T T	G G
Tutr-DRB*01	222 678 TCC	233 901 ACA	333 234 GGC	333 567 CTG	334 890 ATC	444 123 CCT	444 456 AAT	444 789 GGA	555 012 GAC	555 345 TGG	555 678 ACC	566 901 TTC	666 234 CAG	666 567 ACC	667 890 ATG	777 123 GTG	777 456 ATG	777 789 CTT	888 012 GAA	888 345 ACA	888 678 GTC	899 901 CCT	999 234 CAG	999 567 AGT	990 890 GGA
Tutr-DRB*02 Tutr-DRB*03 Tutr-DRB*04 Tutr-DRB*05	· · · · · · ·	· · · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · · ·	G G G G	· · · ·	· · · · · · · ·	· · · · · · · ·	· · · · · · ·		· · · · · · ·	· · · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	 G	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · · ·		· · · ·	· · · ·	· · · · · · · ·
Tutr-DRB*06 Tutr-DRB*07 Tuad-DRB*01	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · ·	· · · · · · ·	· · · ·	G G	· · · · · · ·	· · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · ·	· · · ·	· · · ·	· · · ·	· · · · · · ·
Tuad-DRB*02 Tuad-DRB*03 Tuad-DRB*04	· · · · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · ·	· · · · · ·	· · · · · ·	 G G	· · · · · · ·	· · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · · · ·	· · · · · ·	· · · · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · ·	· · · · · · ·
Tuad-DRB*06 Tuad-DRB*07 BLA-DRB3	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·		G G . A G			· · · · · · ·			· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·			· · · · · · ·	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	· · · · · · ·		 				
HLA-DRB1 Zaca-DRB Tuad-DQB*01	· · · · · · ·	 	 CCT	і Т <u>Т</u>	 <u>†</u>	. A G . G G A G A	· · · ·	 G	· · · · · · ·	· · · ·	· · · ·	· · · · · · ·	· · · ·	 	C C . A C . T	· · · ·	· · · · · · ·	G G	G G	 .TG	T T ACT	 	.G. 	 	· · · · · · ·
Tuad-DQB*02 Tuad-DQB*03 Tutr-DQB*01 Tutr-DQB*02	· · · · · · ·	C		T T T	T T	AGA AGA AGA	· · · ·	G G	· · · · · · ·			· · · · · · ·	· · · ·	. TG . TG . TG	C.T C.T C.T	· · · ·	· · · ·	G G	· · · ·	. TG . TG . TG	ACT ACT ACT	C		CAA CAA CAA	· · · · · · ·
Tutr-DQB*03 Zaca-DQB HLA-DQB1	· · · · · ·	C T	CCT CCA CC.	T T Ţ	T T T	AGA AGG AGG	· · · ·	G G	· · · · · · ·	· · · ·	· · · ·	· · · · · ·	· · · · · · ·	. T Ġ . T . . Ţ .	С.Т С С	· · · ·	· · · ·	G	· · · · · · ·	. TG . TT . TG	ACT ACT ACT	C C C	· · · ·	САА С.А С	· · · · · · ·
RFY-DOR	 666	666	666	666	А 666	666	 666	G	666	 666	666	 666	666		666	666	666	G	666	666	AC. ↓ 666	 Exor 666	 14 666	С.А 666	666
Tutr-DRB*01 Tutr-DRB*02	000 123 GAG	000 456 GTC	000 789 TAC	111 012 ACC	111 345 TGC	111 678 CAC	122 901 GTG	222 234 GAG	222 567 CAC	223 890 CCC	333 123 AGC	333 456 CAG	333 789 ACC	444 012 AGC	444 345 CCT	444 678 GTC	455 901 ACA	555 234 GTG	555 567 GAA	556 890 TGG	666 123 AGG	666 456 GCA	666 789 CAG	777 012 TCT	777 345 GAA
Tutr-DRB*03 Tutr-DRB*04 Tutr-DRB*05									· · · · · · ·				· · · · · · ·						· · · · · · ·			· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·
Tutr-DRB*06 Tutr-DRB*07 Tuad-DRB*01 Tuad-DRB*02	· · · · · · ·	. C . 	· · · · · · ·	· · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · ·	· · · · · · ·
Tuad-DRB*03 Tuad-DRB*04 Tuad-DRB*05	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·				· · · · · · ·	· · · · · · ·			· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·			· · · · · · ·	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	· · · · · · ·		· · · · · · ·		· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·
Tuad-DRB*06 Tuad-DRB*07 BLA-DRB3	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · ·	· · · · · · ·	· · · ·	 A	· · · ·	 †	· · · · · · ·		 . A G	 . <u>Ģ</u> .	 G	· · · · · · ·	· · · · · · ·	 A	· · · · · · ·	 A	· · · · · · ·	· · · · · · ·		· · · ·	 . G .	· · · ·	 ċ
Zaca-DRB Tuad-DQB*01 Tuad-DQB*02	 	· · I · · · · · ·	· · · · · ·	· · · · · ·	· · · · · ·	A A T	· · · · · ·	· · · · · ·	· · · · · ·	A A 	· · · · · ·	TT. .TC	. TG CAG	Ť Ť Ť	 C	С А А	 	· · · · · ·	 G	· · · · · ·	A T T	· · · · · · ·	. G . 	· · · · · ·	G G
Tuad-DQB*03 Tutr-DQB*01 Tutr-DQB*02	T T T	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	T A A		· · · · · · ·	· · · · · · ·			. TC . TC . TC	CAG CAG CAG	T T T	C C C	A A A	. TG . TG . TG	· · · · · · ·	G G G	· · · · · · ·	Т Т Т	· · · · · · ·	· · · · · · ·	· · · · · · ·	. G . . G . . G .
Tutr-DQB*03 Zaca-DQB HLA-DQB1 BLA-DQB	T T C T	· · · · · · ·	· · · ·	· · · · · · ·	· · · ·	T T . G .	 	· · · ·	· · · ·	· · · ·	· · · · · · ·	. TC . TC . TC . TC . TC	CAG CAG CAG CAG	T 	C C C	A A A A	. TG C . TG	· · · ·	G G G	 	T C C	 †	 A	· · · ·	.G.

Fig. 1. (Cont.)

domain, a 23-aa transmembrane domain, and a 16aa cytoplasmic tail. Residues at putative N-linked glycosylation sites and the CD4 binding site were highly conserved. The nucleotide sequence data reported in this paper have been submitted to the GenBank nucleotide sequence database with the following accession numbers: EF017815, EF507877, and EF507878 for *Tutr-DQB*; EF017816, EF507875, and EF507876 for *Tuad-DQB*; EF017817 and EF507863-EF507868 for *Tutr-DRB*; and EF017818 and EF507869-EF507874 for *Tuad-DRB*.

Variations in DQB sequences

Three different *Tuad-DQB* and 3 different *Tutr-DQB* sequences were identified from the RACE-PCR clones. This suggested that the *DQB*-specific primers amplified products from 1 locus if each sequence was considered a unique *DQB* allele.

Tutr-DRB*01	666 777 678 TCT	666 788 901 GCT	666 888 234 CAG	666 888 567 AGC	666 889 890 AAG	666 999 123 ATG	666 999 456 CTG	666 999 789 AGT	777 000 012 GGA	777 000 345 ATC	777 000 678 GGG	777 011 901 GCC	777 111 234 TTT	777 111 567 GTT	777 112 890 CTG	777 222 123 GGT	777 222 456 CTG	777 222 789 CTC	777 333 012 TTC	777 333 345 CTT	777 333 678 GGG	777 344 901 GTG	777 444 234 GGG	777 444 567 CTG	77 44 89 TT
Tutr-DRB*02							Α																		• •
Tutr-DRB*03													• • •												• •
Tutr = DRB + 05										• • •			• • •		• • •								• • •		• •
Tutr-DRB*06													• • •												• •
Tutr-DRB+07							Á.																		• •
Tuad-DRB*01																									
Tuad-DRB*02																									
Tuad-DRB*03																									
Tuad-DRB*04																									
Tuad-DRB*05																									• •
Tuad-DRB*06							A	· · ·					• • •												• •
BLA-DBB3							Δ			Ġ.		G	Ċ								ċċ			Ċ	• •
HLA-DRB1		Â								G.		G.	Č	Ġ		Ċ						ĊĊ			
Zaca-DRB		G								T	A	. G .								C	Ť.				Ġ.
Tuad-DQB*01		C							T	G.T		.G.		G		G		Α		C		С	T	C	Α.
Tuad-DQB*02		C							<u>T</u>	G . T		.G.		G		G		Α		C		Ç	<u>T</u>	C	Α.
Tuad-DQB*03		C							Ţ	G.T		.G.		G		G		A		C		Ç	Ţ	C	Α.
Tutr DQB*01			• • •	• • •	• • •	• • •	• • •		· · [G.I	• • •	. G .	• • •	G	• • •	G	• • •	A			• • •	<u>C</u>	· · [Α.
Tutr=D0B*02	· · · ·		• • •	• • •		• • •	• • •		· · ¦	G T	• • •	.u.		u G		u G		Α	• • •			C	· · · ¦		Α.
Zaca-D0B		· · · C							Ċ	u. 1	Å	G. G.		G		G		Α		C		C	Ċ	U	Â.
HLA-DQB1		C							Č	Ť	A	. G .	Ċ	G		G		A		Č		Č	C	ΞŤ	A.
BLA-DQB		C							T	G.T		.G.	C	G		G		Α		C		С	C	C	Α.
	777	777	777	777	777	777	777	777	Exor 777	15 777	777	777	777	777	777	777	Exo 788	n6 888	888	888					
Tutr-DRB*01	777 555 123 ATC	777 555 456 TAC	777 555 789 TTC	777 666 012 AGG	777 666 345 AAT	777 666 678 CAG	777 677 901 AAA	↓ 777 777 234 GGA	Exor 777 777 567 CAC	15 777 778 890 TCT	777 888 123 GGA	777 888 456 CTT	777 888 789 CAG	777 999 012 CCA	777 999 345 ACA	↓ 777 999 678 GGA	Exo 788 900 901 CTC	n6 888 000 234 CTA	888 000 567 AAC	888 001 890 TGA					
Tutr-DRB*01 Tutr-DRB*02	777 555 123 ATC	777 555 456 TAC	777 555 789 TTC	777 666 012 AGG	777 666 345 AAT	777 666 678 CAG	777 677 901 AAA	↓ 777 777 234 GGA	Exor 777 777 567 CAC	15 777 778 890 TCT	777 888 123 GGA	777 888 456 CTT	777 888 789 CAG	777 999 012 CCA	777 999 345 ACA	↓ 777 999 678 GGA	Exor 788 900 901 CTC	n6 888 000 234 CTA	888 000 567 AAC	888 001 890 TGA					
Tutr-DRB*01 Tutr-DRB*02 Tutr-DRB*03	777 555 123 ATC	777 555 456 TAC	777 555 789 TTC	777 666 012 AGG	777 666 345 AAT	777 666 678 CAG	777 677 901 AAA	↓ 777 777 234 GGA	Exor 777 777 567 CAC	15 777 778 890 TCT 	777 888 123 GGA	777 888 456 CTT 	777 888 789 CAG	777 999 012 CCA	777 999 345 ACA	↓ 999 678 GGA 	Exor 788 900 901 CTC 	n6 888 000 234 CTA 	888 000 567 AAC	888 001 890 TGA					
Tutr-DRB*01 Tutr-DRB*02 Tutr-DRB*03 Tutr-DRB*04 Tutr-DRB*04	777 555 123 ATC 	777 555 456 TAC	777 555 789 TTC 	777 666 012 AGG	777 666 345 AAT	777 666 678 CAG	777 677 901 AAA	↓ 777 234 GGA 	Exor 777 567 CAC	777 778 890 TCT	777 888 123 GGA	777 888 456 CTT 	777 888 789 CAG	777 999 012 CCA	777 999 345 ACA	↓ 999 678 GGA 	Exor 788 900 901 CTC 	n6 888 000 234 CTA 	888 000 567 AAC 	888 001 890 TGA 					
Tutr-DRB*01 Tutr-DRB*02 Tutr-DRB*03 Tutr-DRB*04 Tutr-DRB*05 Tutr-DRB*05	777 555 123 ATC 	777 555 456 TAC 	777 555 789 TTC 	777 666 012 AGG 	777 666 345 AAT 	777 666 678 CAG	777 677 901 AAA 	↓ 777 234 GGA 	Exor 777 567 CAC	777 778 890 TCT	777 888 123 GGA 	777 888 456 CTT 	777 888 789 CAG	777 999 012 CCA	777 999 345 ACA 	↓ 999 678 GGA 	Exor 788 900 901 CTC 	n6 888 000 234 CTA 	888 000 567 AAC 	888 001 890 TGA 					
Tutr-DRB*01 Tutr-DRB*02 Tutr-DRB*03 Tutr-DRB*04 Tutr-DRB*05 Tutr-DRB*05 Tutr-DRB*07	777 555 123 ATC 	777 555 456 TAC 	777 555 789 TTC 	777 666 012 AGG 	777 666 345 AAT 	777 666 678 CAG 	777 677 901 AAA 	↓ 777 234 GGA 	Exor 777 567 CAC	15 777 778 890 TCT 	777 888 123 GGA 	777 888 456 CTT 	777 888 789 CAG	777 999 012 CCA 	777 999 345 ACA 	↓ 777 999 678 GGA 	Exor 788 900 901 CTC 	n6 888 000 234 CTA 	888 000 567 AAC 	888 001 890 TGA 					
Tutr-DRB*01 Tutr-DRB*02 Tutr-DRB*03 Tutr-DRB*04 Tutr-DRB*05 Tutr-DRB*05 Tutr-DRB*06 Tutr-DRB*07 Tuad-DRB*01	777 555 123 ATC 	777 555 456 TAC 	777 555 789 TTC 	777 666 012 AGG 	777 666 345 AAT 	777 666 678 CAG 	777 677 901 AAA 	↓ 777 234 GGA 	Exor 777 567 CAC	15 777 778 890 TCT 	777 888 123 GGA 	777 888 456 CTT 	777 888 789 CAG 	777 999 012 CCA 	777 999 345 ACA 	↓ 777 999 678 GGA 	Exor 788 900 901 CTC 	n 6 888 000 234 CTA 	888 000 567 AAC 	888 001 890 TGA 					
Tutr-DRB*01 Tutr-DRB*02 Tutr-DRB*03 Tutr-DRB*03 Tutr-DRB*05 Tutr-DRB*05 Tutr-DRB*06 Tutr-DRB*01 Tuad-DRB*01	777 555 123 ATC 	777 555 456 TAC 	777 555 789 TTC 	777 666 012 AGG 	777 666 345 AAT 	777 666 678 CAG 	777 677 901 AAA 	↓ 777 234 GGA 	Exor 777 567 CAC	15 777 778 890 TCT 	777 888 123 GGA 	777 888 456 CTT 	777 888 789 CAG 	777 999 012 CCA 	777 999 345 ACA 	↓ 777 999 678 GGA 	Exor 788 900 901 CTC 	n 6 888 000 234 CTA 	888 000 567 AAC 	888 001 890 TGA 					
Tutr-DRB*01 Tutr-DRB*02 Tutr-DRB*03 Tutr-DRB*04 Tutr-DRB*05 Tutr-DRB*06 Tutr-DRB*06 Tutr-DRB*07 Tuad-DRB*02 Tuad-DRB*02 Tuad-DRB*02	777 555 123 ATC 	777 555 456 TAC 	777 555 789 TTC 	777 666 012 AGG 	777 666 345 AAT 	777 666 678 CAG 	777 677 901 AAA 	↓ 777 234 GGA 	Exor 777 567 CAC	15 777 778 890 TCT 	777 888 123 GGA 	777 888 456 CTT 	777 888 789 CAG 	777 999 012 CCA 	777 999 345 ACA 	↓ 777 999 678 GGA 	Exor 788 900 901 CTC 	n 6 888 000 234 CTA 	888 000 567 AAC 	888 001 890 TGA 					
Tutr-DRB*01 Tutr-DRB*02 Tutr-DRB*03 Tutr-DRB*05 Tutr-DRB*05 Tutr-DRB*07 Tuad-DRB*01 Tuad-DRB*01 Tuad-DRB*03 Tuad-DRB*03 Tuad-DRB*03	777 555 123 ATC 	777 555 456 TAC 	777 555 789 TTC 	777 666 012 AGG 	777 666 345 AAT 	777 666 678 CAG 	777 677 901 AAA 	↓ 777 234 GGA 	Exor 777 567 CAC	15 777 778 890 TCT 	777 888 123 GGA 	777 888 456 CTT 	777 888 789 CAG 	777 999 012 CCA 	777 999 345 ACA 	↓ 777 999 678 GGA 	Exor 788 900 901 CTC 	n 6 888 000 234 CTA 	888 000 567 AAC 	888 001 890 TGA 					
Tutr-DRB*01 Tutr-DRB*02 Tutr-DRB*03 Tutr-DRB*05 Tutr-DRB*05 Tutr-DRB*06 Tutr-DRB*07 Tuad-DRB*01 Tuad-DRB*02 Tuad-DRB*03 Tuad-DRB*04 Tuad-DRB*04	777 555 123 ATC 	777 555 456 TAC 	777 555 789 TTC 	777 666 012 AGG 	777 666 345 AAT 	777 666 678 CAG 	777 677 901 AAA 	↓ 777 234 GGA 	Exor 777 567 CAC	15 777 778 890 TCT 	777 888 123 GGA 	777 888 456 CTT 	777 888 789 CAG 	777 999 012 CCA 	777 999 345 ACA 	↓ 777 999 678 GGA 	Exor 788 900 901 CTC 	n 6 888 000 234 CTA 	888 000 567 AAC 	888 001 890 TGA 					
Tutr-DRB*01 Tutr-DRB*02 Tutr-DRB*03 Tutr-DRB*05 Tutr-DRB*05 Tutr-DRB*05 Tutr-DRB*01 Tuad-DRB*01 Tuad-DRB*02 Tuad-DRB*04 Tuad-DRB*05 Tuad-DRB*05 Tuad-DRB*05 Tuad-DRB*05	777 555 123 ATC 	777 555 456 TAC 	777 555 789 TTC 	777 666 012 AGG 	777 666 345 AAT 	777 666 678 CAG 	777 677 901 AAA 	↓ 777 234 GGA 	Exor 777 567 CAC 	15 777 778 890 TCT 	777 888 123 GGA 	777 888 456 CTT 	777 888 789 CAG 	777 999 012 CCA 	777 999 345 ACA 	↓ 777 999 678 GGA 	Exol 788 900 901 CTC 	n 6 888 000 234 CTA 	888 000 567 AAC 	888 001 890 TGA 					
Tutr-DRB*01 Tutr-DRB*02 Tutr-DRB*03 Tutr-DRB*05 Tutr-DRB*06 Tutr-DRB*06 Tutr-DRB*07 Tuad-DRB*02 Tuad-DRB*02 Tuad-DRB*03 Tuad-DRB*05 Tuad-DRB*05 Tuad-DRB*05 Tuad-DRB*07 BLA-DRB3	777 555 123 ATC 	777 555 456 TAC 	777 555 789 TTC 	777 666 012 AGG 	777 666 345 AAT 	777 666 678 CAG 	777 677 901 AAA 	↓ 777 234 GGA 	Exor 777 567 CAC 	15 777 778 890 TCT 	777 888 123 GGA 	777 888 456 CTT 	777 888 789 CAG 	777 999 012 CCA 	777 999 345 ACA 	↓ 777 999 678 GGA 	Exol 788 900 901 CTC 	n 6 888 000 234 CTA 	888 000 567 AAC 	888 001 890 TGA 					
Tutr-DRB*01 Tutr-DRB*02 Tutr-DRB*03 Tutr-DRB*05 Tutr-DRB*05 Tutr-DRB*07 Tuad-DRB*07 Tuad-DRB*03 Tuad-DRB*03 Tuad-DRB*03 Tuad-DRB*04 Tuad-DRB*06 Tuad-DRB*06 Tuad-DRB*07 BLA-DRB1	777 555 123 ATC 	777 555 456 TAC 	777 555 789 TTC 	777 666 012 AGG 	777 666 345 AAT 	777 666 678 CAG 	777 677 901 AAA 	↓ 777 234 GGA 	Exor 777 567 CAC 	15 777 778 890 TCT 	777 888 123 GGA AC.	777 888 456 CTT 	777 888 789 CAG 	777 999 012 CCA 	777 999 345 ACA 	↓ 777 999 678 GGA 	Exor 788 900 901 CTC 	n 6 888 000 234 CTA 	888 000 567 AAC 	888 001 890 TGA 					
Tutr-DRB*01 Tutr-DRB*02 Tutr-DRB*03 Tutr-DRB*05 Tutr-DRB*05 Tutr-DRB*05 Tutr-DRB*01 Tuad-DRB*02 Tuad-DRB*02 Tuad-DRB*04 Tuad-DRB*05 Tuad-DRB*05 Tuad-DRB*05 Tuad-DRB*07 BLA-DRB3 HLA-DRB1 Zaca-DRB	777 555 123 ATC 	777 555 456 TAC 	777 555 789 TTC 	777 666 012 AGG 	777 666 345 AAT 	777 666 678 CAG 	777 677 901 AAA 	↓ 777 234 GGA 	Exor 777 567 CAC 	15 777 778 890 TCT C	777 888 123 GGA A.C	777 888 456 CTT 	777 888 789 CAG 	777 999 012 CCA 	777 999 345 ACA 	↓ 777 999 678 GGA 	Exor 788 900 901 CTC 	n 6 888 000 234 CTA 	888 000 567 AAC 	888 001 890 TGA 					
Tutr-DRB*01 Tutr-DRB*02 Tutr-DRB*03 Tutr-DRB*05 Tutr-DRB*05 Tutr-DRB*05 Tutr-DRB*01 Tuad-DRB*01 Tuad-DRB*04 Tuad-DRB*04 Tuad-DRB*05 Tuad-DRB*05 Tuad-DRB*05 Tuad-DRB*07 BLA-DRB3 HLA-DRB3 HLA-DRB1 Zaca-DRB Tuad-DRB*07	777 555 123 ATC 	777 555 456 TAC 	777 555 789 TTC 	777 666 012 AGG 	777 666 345 AAT 	777 666 678 CAG 	777 677 901 AAA 	↓ 777 777 234 GGA 	Exor 777 567 CAC	15 7777 778 890 TCT C	777 888 123 GGA AC	777 888 456 CTT 	7777 888 789 CAG	777 999 CCA 	777 999 345 ACA 	↓ 777 9998 GGA 	E x of 788 900 901 CTC T T	n 6 888 000 234 CTA 	888 000 567 AAC 	888 001 890 TGA 					
Tutr-DRB*01 Tutr-DRB*02 Tutr-DRB*03 Tutr-DRB*05 Tutr-DRB*05 Tutr-DRB*07 Tuad-DRB*01 Tuad-DRB*02 Tuad-DRB*03 Tuad-DRB*05 Tuad-DRB*05 Tuad-DRB*05 Tuad-DRB*07 BLA-DRB3 HLA-DRB1 Zaca-DRB Tuad-DQB*01 Tuad-DQB*01	777 5553 ATC 	777 5556 TAC 	777 5557 789 TTC CA. CA.	777 6666 012 AGG 	777 6665 345 AAT 	7777 666 678 CAG	777 677 901 AAA 	↓ 7777 2234 GGA 	E x or 777 777 7567 C A C 	15 7777 890 TCT C C	777 888 123 GGA AC. 	7777 8888 456 CTT 	7777 8888 789 CAG 	777 9999 CCA 	777 999 345 ACA	7777 9999 678 GGA 	E x ol 788 9001 CTC T T	n 6 888 000 234 CTA 	8888 000 567 AAC 	888 001 164 					
Tutr-DRB*01 Tutr-DRB*02 Tutr-DRB*03 Tutr-DRB*05 Tutr-DRB*05 Tutr-DRB*07 Tuad-DRB*01 Tuad-DRB*03 Tuad-DRB*03 Tuad-DRB*03 Tuad-DRB*03 Tuad-DRB*03 Tuad-DRB*06 Tuad-DRB*06 Tuad-DRB*07 BLA-DRB1 Zaca-DRB Tuad-DQB*01 Tuad-DQB*01 Tuad-DQB*02 Tuad-DQB*01	7777 5555 123 ATC 	7777 5555 4566 7AC 	7777 5555 7789 TTC 	777 666 012 AGG	7777 6666 345 AAT	7777 666 678 CAG	7777 901 AAA 	↓ 7777 7777 234 GGA	Exor 777 567 CAC	15 7777 8900 TCT C C C	7777 8888 123 GGA AC 	7777 888 456 CTT	7777 8888 789 CAG 	7777 9999 012 CCA	7777 999 345 ACA	777 999 678 GGA 	Exor 788 900 901 CTC T T 	n 6 888 000 234 CTA 	888 000 567 AAC 	888 001 890 TGA					
Tutr-DRB*01 Tutr-DRB*02 Tutr-DRB*03 Tutr-DRB*05 Tutr-DRB*05 Tutr-DRB*05 Tutr-DRB*02 Tuad-DRB*02 Tuad-DRB*02 Tuad-DRB*03 Tuad-DRB*04 Tuad-DRB*05 Tuad-DRB3 HLA-DRB3 HLA-DRB3 Tuad-DRB*07 BLA-DRB1 Zaca-DRB Tuad-DQB*01 Tuad-DQB*02 Tuad-DQB*03 Tutr-DQB*03	777 555 123 ATC	777 555 456 TAC	7777 5555 789 TTC 	7777 6666 012 AGG	7777 6666 345 AAT	777 666 678 CAG	7777 901 AAA 	J 7777 7777 234 GGA	Exor 777 567 CAC	15 7777 8900 TCT C C C	777 888 123 GGA AC. AC. 	7777 8888 456 CTT 	7777 888 789 CAG 	7777 9999 012 CCA	7777 999 345 ACA	7777 999 678 GGA 	Exoc 788 900 9001 CTC	n6 888 000 234 CTA 	888 000 567 AAC	888 001 890 TGA					
Tutr-DRB*01 Tutr-DRB*02 Tutr-DRB*03 Tutr-DRB*05 Tutr-DRB*05 Tutr-DRB*05 Tutr-DRB*01 Tuad-DRB*02 Tuad-DRB*02 Tuad-DRB*04 Tuad-DRB*04 Tuad-DRB*05 Tuad-DRB*07 BLA-DRB3 HLA-DRB3 HLA-DRB1 Tuad-DRB*01 Tuad-DQB*03 Tutr-DQB*03 Tutr-DQB*03	777 555 123 ATC	7777 5555 4566 TAC 	7777 5555 789 TTC 	7777 6666 012 AGG	7777 6666 345 AAT 	777 666 678 CAG	7777 901 AAA 	↓ 7777 2334 GGA 	Exord 7777 567 CAC	15 7777 778 890 TCT 	7777 888 123 GGA AC. AC. 	7777 888 456 CTT	7777 888 789 CAG 	7777 9999 012 CCA	7777 9999 345 ACA	7777 999 678 GGA 	Exoc 7888 900 9001 CTC	n6 888 000 234 CTA 	888 000 567 AAC	888 001 890 TGA					
Tutr-DRB*01 Tutr-DRB*02 Tutr-DRB*03 Tutr-DRB*05 Tutr-DRB*05 Tutr-DRB*01 Tuad-DRB*01 Tuad-DRB*01 Tuad-DRB*03 Tuad-DRB*05 Tuad-DRB*05 Tuad-DRB*07 BLA-DRB3 HLA-DRB1 Zaca-DRB Tuad-DQB*01 Tuad-DQB*02 Tuad-DQB*02 Tuad-DQB*03 Tuad-DQB*03 Tuad-DQB*03 Tutr-DQB*03 Zaca-DQB	7777 5555 123 ATC 	7777 5555 4566 TAC 	7777 5555 789 TTC CA. CA. CA. CA. CA. CA. CA.	7777 6666 012 AGG	7777 6666 345 4AT 	7777 666 678 CAG	7777 6777 901 AAAA 	↓ 7777 2334 GGA 	E xon 777 777 567 CAC 	15 7777 778 890 TCT C C C C C	7777 8888 123 GGA AC. AC. AC. 	7777 8888 456 CTT 	7777 888 789 CAG	7777 9999 012 CCA 	7777 999 345 ACA 	- -	Exoc 7888 900 900 900 CTC	n6 888 000 234 CTA 	888 000 567 AAC 	888 001 890 TGA					

Fig. 1. Nucleotide sequence alignment of coding regions of the *DQB* and *DRB* genes among bottlenose dolphins, human, cattle, and California sea lion. Abbreviations for individual species MHC molecules are as follows: *Tutr*, common bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*); *Tuad*, Indo-Pacific bottlenose dolphin (*Tursiops aduncus*); *Zaca*, California sea lion (*Zalophus californianus*); HLA, human lymphocyte antigen; and BLA, bovine lymphocyte antigen. The complete nucleotide sequence of *Tutr-DRB*01* is shown. Single letters and dots below the nucleotide sequence represent nucleotides that are respectively distinct from or identical to *Tutr-DRB*01*. Boxes indicate codons used to distinguish *DQB* from *DRB*. Borders of each domain were assigned based upon the sequence homology between *Tutr-DRB*01* and *Zaca-DRB* (California sea lion *DRB*, GenBank accession no. AY491464). Allelic numbers for bottlenose dolphin sequences were assigned according to multispecies guidelines (Klein and Takahata 1990).

None of the sequences showed signs of pseudo-The similarity between Tuad-DQB genes. sequences was extremely high, with each containing only 2 or 3 unique nucleotides. The deduced amino acid sequences indicated that all 4 polymorphisms represented non-synonymous nucleotide substitutions (Table 2). Of the 4 polymorphic amino acid residues, 1 was found in the β 1 domain, which encodes the putative MHC class II peptide-binding groove (Brown et al. 1993, Stern et al. 1994), 2 were found in the β 2 domain, and 1 in the transmembrane domain. In comparison, variations among the Tutr-DQB sequences were relatively high (23 nucleotide positions). Of these 23 variable sites, the majority were in exon 2 (18/23), with the remainder distributed between exons 1 (1/23), 3 (3/23), and 4 (1/23). The deduced amino acid sequences indicated that over 90% of the nucleotide substitutions (21/23) were non-synonymous (Table 2). The divergence of non-synonymous substitutions was significant at the codons of the PBR (Table 3; p < 0.01). The polymorphic Tutr-DQ β amino acid residues (n = 16) were located in the β 1 (13/16) and β 2 domains (3/16). The relative positions of these polymorphic residues were examined using the HLA-DR model for class II peptide binding (Brown et al. 1993, Stern et al. 1994). *Tutr*-DQ β polymorphism was observed at residues 9, 13, 26, 27, 31, 41, 40, 56, 57, 61, 86, 89, 90, 104, 118, and 174. While 13 of these polymorphic sites were located in the putative peptide-binding groove, 6 (residues 9, 13, 56, 61, 86, and 89) coincided with those described in

Table 2. Sequence polymorphism of *Tuad-DQB*, *Tutr-DQB*, *Tuad-DRB*, and *Tutr-DRB*, delineated by exon. Abbreviations for individual species MHC molecules are as described in the legend to figure 1

Exon	1	2	3	4	5	6
Tuad-DQB						
Synonymous	0	0	0	0	0	0
Non-synonymous	0	1	2	1	0	0
Tutr-DQB						
Synonymous	1	1	0	0	0	0
Non-synonymous	0	17	3	1	0	0
Tuad-DRB						
Synonymous	0	9	2	0	0	0
Non-synonymous	1	29	2	1	0	0
Tutr-DRB						
Synonymous	3	3	1	0	0	0
Non-synonymous	2	24	4	1	0	0

humans (Brown et al. 1993, Stern et al. 1994).

Variations in DRB sequences

Seven different Tuad-DRB and 7 different Tutr-DRB sequences were identified from the RACE-PCR clones. These results suggested that the amplified products came from at least 2 loci in DRB genes per individual. All sequences had features comparable with classical MHC class II transcripts in other species. Variations among the Tuad-DRB sequences were relatively high (44 nucleotide positions) compared to those of Tuad-DQB. Of these 44 variable sites, the majority were in exon 2 (38/44), with the remainder being distributed in exons 1 (1/44), 3 (4/44), and 4 (1/44). The deduced amino acid sequences indicated that the substitutions clearly tended to be clustered around the PBR (Table 2). The divergence of non-synonymous substitutions was significant at the codons of the PBR (Table 3; p < 0.005). The polymorphic Tuad-DR β amino acid residues (*n* = 25) were located in the leader peptide (1/25), the β 1 domain (21/25), the β 2 domain (2/25), and the transmembrane domain (1/25). *Tuad*-DR β polymorphisms were observed at residues -1, 6, 9, 11, 22, 26, 27, 30, 31, 37, 40, 47, 57, 60, 67, 70, 71, 78, 81, 86, 88, 91, 117, 149, and 200. While 19 of these polymorphic sites were located in the putative peptidebinding groove, 12 (residues 9, 11, 30, 37, 47, 60, 70, 71, 78, 81, 86, and 88) coincided with those described in humans. Variations among Tutr-DRB sequences were also high (38 nucleotide positions), among which the majority were found in exon 2 (27/38), with the remainder being distributed in exons 1 (5/38), 3 (5/38), and 4 (1/38). The deduced amino acid sequences indicated that the substitutions clearly tended to be clustered around the PBR (Table 2). The divergence of non-synonymous substitutions was significant at codons of the PBR (Table 3; p < 0.005). The polymorphic Tutr- $DR\beta$ amino acid residues (*n* = 26) were located in the leader peptide (2/26), the β 1 domain (19/26), the β 2 domain (4/26), and the transmembrane domain (1/26). *Tutr*-DR β polymorphisms were observed at residues -22, -3, 9, 13, 14, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 34, 47, 52, 67, 71, 72, 74, 78, 86, 90, 149, 160, 168, 170, and 200. While 19 of these polymorphic sites were located in the putative peptide-binding groove, only 9 (residues 9, 13, 28, 30, 47, 71, 74, 78, and 86) coincided with those described in humans.

	↓ Leader			↓ Beta1	* * *	^^^ *	* * **	*	*
Tutr-DRB*01 Tutr-DRB*02	MVSLYFS	RGSWMAALTV	ILMVLSPPLS	12345678 WARETPSLFM	9012345678 NQFKSYCHFS	9012345678 NGTERVRFVE	2333333333 9012345678 KHTYNREEYV	9012345678 RFDSDVGEYR	455555555555 90123456789 AVTKLGRPDAE
Tutr-DRB*03 Tutr-DRB*04 Tutr-DRB*05 Tutr-DRB*06		G	A	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	YGE YGE YGE	LLV LLV LLV	RNI RNI RNI	н. н. н.	E E
Tutr-DRB*07 Tuad-DRB*01 Tuad-DRB*02		G	A	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	Y.L.AE	V	RCL RDIL.		E
Tuad-DRB*03 Tuad-DRB*04 Tuad-DRB*05		G	A	. T	AE Y.L.AE	LLV GLLV V	RDI RDI RC	Н. Н. Е.	E E
Tuad-DRB*00 Tuad-DRB*07 BLA-DRB3 HLA-DRB1	C	GI. G	A MA TS.A	IQPH.L L.GD.RPR.L	Y.L.AE EYY.GEF E.V.HEF	V	RC R.FGF. RYF.HQS.		EA EA
Zaca-DRB Tuad-DQB*01 Tuad-DQB*02	LC.C.L MSGT.A.QIP MSGT.A.QIP	GL.TT.VM. L.TT.VM. L.TT.VM.	A M.TT.EA M.TT.EA	DPH.L EG.DS.QD.L EG.DS.QD.L	ELL.GE.Y. YRHMGM.Y.T YRHMGM.Y.T	LLV L.v	R.IF. RYIF. RYIF.	F.	PET
Tutr-DQB*02 Tutr-DQB*02 Tutr-DQB*03	MSGT.A.QIP MSGT.A.QIP MSGT.A.QIP	L.TT.VM. L.TT.VM. L.TT.VM.	M.TT.EA M.TT.EA M.TT.EA M.TT.EA	EG.DS.QD.L EG.DS.QD.L EG.DS.QD.L	IRHMGM.Y.T IRHMGM.Y.T FRHMFM.Y.T	GMS GMS 	RYI RYI RYM	F. .SGF.	E
Zaca-DQB HLA-DQB1 BLA-DQB	MA.RIP MSWKKA.RIP MFGA.RIP	L.TEMM G.LRA.TV.L .AL.T.VVM.	VI.VA M.SMT.VA T.VMT.GA	EG.DS.QD.V EG.DS.ED.V EG.DS.KD.V	FGE.Y.T YGM.Y.T VMGQ.Y.T	SLT L.S Y.T	RYI RSII. RYIQA		PE LL.A .LA
	** * * 6666666666	** * * *	** ** ** 8888888888	↓ Beta 99999999999	12 111111111111 00000000000000000000000	11111111111 11111111111	11111111111 222222222222	11111111111 3333333333333	111111111111 444444444445
Tutr-DRB*01 Tutr-DRB*02 Tutr-DBB*03	0123456789 YWNSQKDLLE	0123456789 QKQAKVDTYC 	0123456789 RHNYGVVESF	0123456789 TVQRRVAPTV	0123456789 TVYPAKTQPL	0123456789 QHHNLLVCSV	0123456789 NGFYPGHIEV	0123456789 RWFRNGQEEE	01234567890 AGVVSTGLIPN
Tutr-DRB*04 Tutr-DRB*05 Tutr-DRB*06	F F 	. RR . E F . . RR . E F . . RR . E F .		M	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
Tuad-DRB*01 Tuad-DRB*02 Tuad-DRB*03		RHR.EV. .RR.EV. .RR.EV.	.YR.G R.F.P. R.D.P.		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	R		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
Tuad-DRB*04 Tuad-DRB*05 Tuad-DRB*06	F KF	. RR . E V . RHR . E V . . RR . E V .	R.D.P. .YR.G R.F.P.		· · · · · · · · · · · · · · · ·	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·			
BLA-DRB3 HLA-DRB1 Zaca-DRB	HF	R . E RV . . RR . E RR . E V .		E Y . E . E	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	S	HK	Q. TQ.
Tuad-DQB*01 Tuad-DQB*02 Tuad-DQB*03 Tutr-D0B*01	G.E G.E G.E	. RR . AL V . . RR . AL V . . RR . AL V . . FR . AL V .	RIHKT. RIHKT. RIHKT.	E ME E	. IS.SR.EA. . IS.SR.EV. . IS.SR.EA.	N N S N	TDQ.K. TDQ.K. TDQ.K.	D T D T D T	PR. PR. PR. PR.
Tutr-DQB*02 Tutr-DQB*03 Zaca-DQB	. F	.ER.AV. .ER.AV. RTR.EAV.	RID.TL RIG.T. IE.RT	AE E ILE	. IS R.EA. . IS. SR.EA. . IS. SR.EV.	NT. NN.	TDQ.K. TDQ.K. TDQ.K. TDQ.K.	DT DT DT	PR.
HLA-DQB1 BLA-DQB	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	R.R.ARV. .TW.ERV.	QLELRT .NQ.EAP.	.LE .WQ.E	.IS.SR.EA. .IS.SR.EA.	N N	TDAQ.K. TDQ.K.	DT DRT	PR. PG.
	1111111111 5555555555 1234567890	1111111111 66666666667 1234567890	1111111111 7777777778 1234567890	1111111111 8888888888 1234567890	1111111112 99999999990 1234567890	2222222222 0000000001 1234567890	2222222222 1111111112 1234567890	2222222222 22222222223 1234567890	22222222 33333333 12345678
Tutr-DRB*02 Tutr-DRB*03 Tutr-DRB*04		LETVPQ5GEV		15PVIVEWRA	USESAUSKML		LFLGVGLF11		UPTULLN*
Tutr-DRB*05 Tutr-DRB*06 Tutr-DRB*07 Tued-DRB*01		EA		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	M				· · · · · · · · · · · ·
Tuad-DRB*02 Tuad-DRB*03 Tuad-DRB*04	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
Tuad-DRB*05 Tuad-DRB*06 Tuad-DRB*07 BLA-DRB3	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	ор кв	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·			Δ	 	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
HLA-DRB1 Zaca-DRB Tuad-DQB*01	L 	R	QL	L M QIMW.	R	V . G	A VV ILI.R	H.S	F.S. S.
Iuad-DQB*02 Tuad-DQB*03 Tutr-DQB*01 Tutr-D0B*02	ML ML	MTQ.D. MTQ.D. MTQ.D.	L L QL	QIMW. QIMW. QIMW.	G	V . G V . G V . G V . G	ILI.R ILI.R ILI.R IL.I.R	H.S H.S H.S	
Tutr-DQB*03 Zaca-DQB HLA-DQB1		MTQ.D. ITR.D. MTR.D.	L	QIMW. QI QI.	G	V . G	ILI.R ILI.R IL.I.H	H.S H.S H.S	H. H.
DLA-DUD	🗠	wiK.U.	n L	QIWI		v . u	IL.I.K	11.0	wĸ.

Fig. 2. Amino acid sequence alignment between bottlenose dolphins, human, cattle, and California sea lion $DQ\beta$ and $DR\beta$ sequences. Abbreviations for individual species MHC molecules are as described in the legend to figure 1. The complete amino-acid sequence of *Tutr-DRB*01* is shown. Single letters and dots below the amino-acid sequence represent amino acids that are respectively distinct from or identical to *Tutr-DRB*01*. Asterisks indicate putative positions corresponding to the peptide-binding region as shown by Brown et al. (1993). A box indicates the putative CD4 binding site. Carets (^) indicate putative *N*-linked glycosylation sites. Borders of each domain were assigned based upon the sequence homology between *Tutr-DRB*01* and *Zaca-DRB* (California sea lion *DRB*, GenBank accession no. AY491464).

Phylogenetic analyses

The phylogeny based on the full-length coding region of DQB and DRB sequences from T. aduncus, T. truncatus, cattle, human, and California sea lion revealed 2 clades of genes corresponding to DQB and DRB, respectively (Fig. 3a). Sequences from dolphins formed a monophyletic group separated from other mammals with strong bootstrap support (100%) in both the DQB and DRB clades. This tree also showed that dolphins were more closely related to cattle than to humans or sea lions in both the DQB and DRB phylogenies. In the DQB clade, the monophyly of T. aduncus- and T. truncatus-specific alleles was supported by strong bootstrap values. Two wellsupported dolphin groups could be seen in the DRB clade, and the monophyly of T. aduncus- and T. truncatus-specific alleles was also supported by strong bootstrap values in both groups, indicating that there are likely 2 DRB loci in bottlenose dolphins. The NJ tree based on exon 2 only (Fig. 3b) showed a similar phylogenetic relationship to figure 3a. In comparison, the NJ tree based on exons 3-6 (Fig. 3c) showed a different phenomenon from the other 2 trees. Although the DQB and DRB sequences of dolphins still formed monophyletic groups respectively separated from other mammals with strong bootstrap support (100%), there was no support for groups uniting sequences of the same dolphin species in either the DQB or DRB clade.

DISCUSSION

Previous studies of the cetacean MHC mainly

examined exon 2, which encodes the functionally important PBR, from individual MHC class II genes (Murray et al. 1995, Murray and White 1998, Hayashi et al. 2003 2006, Yang et al. 2005, Baker et al. 2006, Martinez-Aguero et al. 2006). While those studies present valuable information, variation at 1 part of a gene, or 1 gene, is not an appropriate measure of variation for the entire MHC (Murray and White 1998). It is possible that low diversity at the MHC has been observed only because short fragments (usually about 200 bp) were amplified and the functionality of the alleles was not taken into account (e.g., Sommer 2003, Amills et al. 2004), which might lead to a misinterpretation of the results (Axtner and Sommer 2007), with the possible consequence that a severe population bottleneck is inferred (Baker et al. 2006). Therefore, characterization of full-length expressed sequences of MHC genes is very important for making valid evolutionary inferences on non-model species like bottlenose dolphins. Such information is also crucial for evaluating MHC diversity at the population level.

In this study, we used RACE technology to amplify full-length expressed class II gene sequences. This is the first identification of sequence polymorphisms throughout the entire length of both *DQB* and *DRB* gene products in bottlenose dolphins that are potentially subject to different pathogen pressures. This allows investigations into the effects of different environmental influences on MHC diversity in ongoing studies. Furthermore, we describe the bottlenose dolphin MHC-specific oligonucleotides for full-length amplification that will be useful in future work on bottlenose dolphin MHC research. We present 20 novel full-length expressed *DQB* and *DRB* alleles

Table 3. Number of synonymous substitutions per synonymous site (d_S) , and the number of non-synonymous substitutions per non-substitution site (d_N) at the peptide-binding region (PBR), non-PBR, and all regions of MHC *DQB* exon 2. Abbreviations for individual species MHC molecules are as described in the legend to figure 1

	P	BR	Non-	PBR	All re	gions
	d _s	d _N	d _s	d _N	d _s	d _N
Tuad-DQB	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0.6 ± 0.3	0 ± 0	0.5 ± 0.2
Tutr-DQB	0 ± 0	8.9 ± 3.5*	1.1 ± 0.6	1.2 ± 0.4	0.9 ± 0.5	2.5 ± 0.6
Tuad-DRB	4.7 ± 2.4	16.9 ± 4.7*	0.8 ± 0.4	1.1 ± 0.4	1.5 ± 0.5	3.5 ± 0.7
Tutr-DRB	2.1 ± 1.5	10.5 ± 2.7*	1.9 ± 0.7	1.4 ± 0.4	1.9 ± 0.6	2.8 ± 0.6

 d_N and d_S are indicated as percentages. Standard errors were calculated using 500 bootstrap replications. * p < 0.05 denotes values of d_N that are significantly greater than d_S .







Fig. 3. Neighbor-joining trees for *DQB* and *DRB* genes with Kimura's 2-parameter model based on 5000 bootstrap replications. HLA-*DPB* (GenBank accession number NM_002121) was used as the outgroup. The datasets for tree construction are (a) the full-length coding region; (b) only exon 2; and (c) exons 3-6. Abbreviations for individual species MHC molecules are as described in the legend to figure 1.

from 2 T. truncatus and 2 T. aduncus individuals collected from the western Pacific. The high proportions of non-synonymous nucleotide substitutions in the putative peptide-binding regions of Tutr-DQB, Tuad-DRB, and Tutr-DRB suggest positive selection pressure on these gene loci (Hughes and Yeager 1998) and imply functional roles for these molecules in pathogen-specific immune responses. However, several features do not support a traditional role for Tuad-DQB molecules in peptide binding, including the extremely low number of non-synonymous residue substitutions in exon 2 and the overall lack of sequence variation. Sampling error is unlikely an explanation, since the samples were collected from 2 different regions (Taiwan and Indonesia). This unusual pattern of non-synonymous and synonymous substitutions closely resembles that used to describe non-classical MHC class I genes. The products of nonclassical genes are not directly involved in peptide binding and are less polymorphic although they are evolutionarily related and structurally similar to classical genes (Meyer and Thomson 2001). It is important to conduct studies on differences in the immunological functionalities of the DQB gene in T. aduncus by comparing other genotypes between distinct populations before further conclusions can be drawn regarding the immunological importance of Tuad-DQB molecules.

Until now, the analyses of MHC class II genes studied in marine mammals have suggested that immunogenetic diversity is generated by polymorphisms at several specific loci, a reasonable assumption based on established knowledge in terrestrial species (Bowen et al. 2004). Previous surveys reported a single DQB locus in the beluga whale, narwhal (Murray et al. 1995), and finless porpoise (Hayashi et al. 2006). The beluga whale has also been reported to have 2 DRB loci (Murray and White 1998) whose sequences are closely related to the DRB3 gene of cattle. Our results revealed 1 DQB locus and 2 DRB loci in bottlenose dolphins, which is congruent with the results mentioned above. However, multiple copies of DQB were reported in the Baiji (Yang et al. 2005), humpback whale, and right whale (Baker et al. 2006). It was suggested that multiple DQB loci are an ancestral condition shared with ruminants in early-divergence cetacean species, and this condition has been lost in more-derived species such as small-toothed whales (Baker et al. 2006). In addition, baleen whales have been speculated to have only 1 DRB locus (Baker et al. 2006). Taking this evidence together, our results show that bottlenose dolphins and other smalltoothed whales have very similar locus numbers in *DQB* and *DRB* genes corresponding to their evolutionary relationship.

The phylogenetic analyses of the full-length region and exon 2 of DQB and DRB showed no mixture but a clear division between T. truncatus and T. aduncus. This is an intriguing result compared to the general trans-specific pattern of evolution observed for MHC loci (Hughes 1999), which means that some alleles from an individual are more similar to those from other individuals of different species than to those of the same species. Hayashi et al. (2003) reported trans-specific patterns of the DQB gene in cetaceans, but their work included only 1 individual for 11 of 16 examined species, and their results require further investigation. The species-specific clustering of DQB or DRB loci has been described in a few species (South African antelope by van der Walt et al. 2001, cotton rats by Pfau et al. 1999) and several possible explanations have been proposed including sampling error, phylogeographic partitioning, and species-specific adaptations. The first 2 explanations are less likely in our case because we chose different sampling sites (Taiwan, Japan, and Indonesia) although the sample size is small. Since T. truncatus and T. aduncus have different diets, microflora, and distributions (Wang et al. 1999, Wang 2003), it is thus reasonable to assume that different selective pressures from pathogens exist in oceanic (T. truncatus) and coastal (T. aduncus) waters. The most likely explanation for our result is that species-specific alleles may have adaptive value for certain species and can be discriminately selected. When the selective advantage of MHC alleles differs among environments that vary in the diversity and abundance of pathogens, pathogen-driven directional selection could act differentially among individuals from distinct populations (Bernatchez and Landry 2003). This would have resulted in sequence divergence of exon 2 in bottlenose dolphins as observed in this study. A more-thorough analysis of geographic variations of polymorphisms, allelic frequencies, and evolution of the MHC should prove insightful because bottlenose dolphins have such a broad geographic distribution and are exposed to considerable environmental variation. The suggested directions of subsequent investigations include (1) studies of the sequence diversity of DQB and DRB genes with a larger number of bottlenose dolphin specimens from the western Pacific; and (2) the molecular characterization and genetic diversity of MHC class II loci of 2 ecotypes of *T. truncatus* (coastal and offshore) in the northwestern Atlantic to determine how important the pathogen-driven directional selection has been in bottlenose dolphin MHC evolution. In addition, because all current regional and international conservation legislation recognizes only 1 species of *Tursiops* (Wang et al. 1999), understanding potential differences in MHC characterization among bottlenose dolphins will have important implications for effective conservation programs.

Acknowledgments: We thank the Taiwan Cetacean Society, Hong Kong Ocean Park, and Hualien Ocean Park for providing blood samples of bottlenose dolphins. This study could not have been carried out without funding support from Mission Biotech Corp. of Taiwan. We also appreciate the colleagues in the laboratories of J.M. Hu and L.S. Chou for useful comments and technical support. This study was funded by grants to LSC from the Council of Agriculture of Taiwan (94AS-9.1.7-FB-e1(8) and 95AS-11.1.3-FB-e1(10)).

REFERENCES

- Acevedo-Whitehouse K, F Gulland, D Greig, W Amos. 2003. Inbreeding: disease susceptibility in California sea lions. Nature **422**: 35.
- Altschul S, W Gish, W Miller, E Myers, D Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215: 403-410.
- Amills M, N Jimenez, J Jordana, A Riccardi, A Fernandez-Arias, J Guiral, JL Bouzat, J Folch, A Sanchez. 2004. Low diversity in the major histocompatibility complex class II DRB1 gene of the Spanish ibex, Capra pyrenaica. Heredity 93: 266-272.
- Axtner J, S Sommer. 2007. Gene duplication, allelic diversity, selection processes and adaptive value of MHC class II *DRB* genes of the bank vole, *Clethrionomys glareolus*. Immunogenetics (in press)
- Baker CS, MD Vant, ML Dalebout, GM Lento, SJ O'Brien, N Yuhki. 2006. Diversity and duplication of *DQB* and *DRB*like genes of the MHC in baleen whales (suborder: Mysticeti). Immunogenetics **58**: 283-296.
- Bernatchez L, C Landry. 2003. MHC studies in nonmodel vertebrates: What have we learned about natural selection in 15 years? J. Evol. Biol. **16:** 363-377.
- Bontrop RE, DI Watkins. 2005. MHC polymorphism: AIDS susceptibility in non-human primates. Trends Immunol. **26**: 227-233.
- Bowen L, BM Aldridge, F Gulland, W Van Bonn, R DeLong, S Melin, LJ Lowenstine, JL Stott, ML Johnson. 2004. Class II multiformity generated by variable MHC-DRB region configurations in the California sea lion (*Zalophus californianus*). Immunogenetics **56**: 12-27.
- Bowen L, BM Aldridge, F Gulland, J Woo, W Van Bonn, R DeLong, JL Stott, ML Johnson. 2002. Molecular characterization of expressed DQA and DQB genes in

the California sea lion (*Zalophus californianus*). Immunogenetics **54:** 332-347.

- Brown JH, TS Jardetzky, JC Gorga, LJ Stern, RG Urban, JL Strominger, DC Wiley. 1993. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. Nature **364:** 33-39.
- de Swart RL, PS Ross, JG Vos, AD Osterhaus. 1996. Impaired immunity in harbour seals (*Phoca vitulina*) exposed to bioaccumulated environmental contaminants: review of a long-term feeding study. Environ. Health Pers. **104(Supplement 4):** 823-828.
- Gao A, K Zhou, Y Wang. 1995. Geographical variation in morphology of bottlenose dolphins (*Tursiops* sp.) in Chinese waters. Aquat. Mamm. **21**: 121-135.
- Harvell CD, K Kim, JM Burkholder, RR Colwell, PR Epstein, DJ Grimes, EE Hofmann, EK Lipp, AD Osterhaus, RM Overstreet, JW Porter, GW Smith, GR Vasta. 1999. Emerging marine diseases-climate links and anthropogenic factors. Science 285: 1505-1510.
- Hayashi K, S Nishida, H Yoshida, M Goto, L Pastene, H Koike. 2003. Sequence variation of the *DQB* allele in the cetacean MHC. Mamm. Study **28**: 89-96.
- Hayashi K, H Yoshida, S Nishida, M Goto, LA Pastene, N Kanda, Y Baba, H Koike. 2006. Genetic variation of the MHC DQB locus in the finless porpoise (*Neophocaena phocaenoides*). Zool. Sci. **23**: 147-153.
- Hughes AL, M Yeager. 1998. Natural selection at major histocompatibility complex loci of vertebrates. Annu. Rev. Genet. 32: 415-435.
- Hughes AL. 1999. Adaptive evolution of genes and genomes. New York: Oxford Univ. Press. IUCN. 2006. 2006 IUCN Red list of threatened species. Available at http://www. iucnredlist.org/.
- Kennedy LJ, R Ryvar, RM Gaskell, DD Addie, K Willoughby, SD Carter, W Thomson, WE Ollier, AD Radford. 2002. Sequence analysis of MHC DRB alleles in domestic cats from the United Kingdom. Immunogenetics 54: 348-352.
- Klein J, A Sato. 1998. Birth of the major histocompatibility complex. Scand. J. Immunol. **47**: 199-209.
- Klein J, N Takahata. 1990. The major histocompatibility complex and the quest for origins. Immunol. Rev. **113**: 5-25.
- Kumar S, K Tamura, M Nei. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. Brief. Bioinform. 5: 150-163.
- Leatherwood S, R Reeves. 1990. The bottlenose dolphin. San Diego, CA: Academic Press.
- Marsh SG, ED Albert, WF Bodmer, RE Bontrop, B Dupont, HA Erlich, DE Geraghty, JA Hansen, CK Hurley, B Mach, WR Mayr, P Parham, EW Petersdorf, T Sasazuki, GM Schreuder, JL Strominger, A Svejgaard, PI Terasaki, J Trowsdale. 2005. Nomenclature for factors of the HLA system, 2004. Tissue Antigens **65**: 301-369.
- Martínez-Agüero M, S Flores-Ramírez, M Ruiz-García. 2006. First report of major histocompatibility complex class II loci from the Amazon pink river dolphin (genus *Inia*). Genet. Mol. Res. **5:** 421-431.
- Meyer D, G Thomson. 2001. How selection shapes variation of the human major histocompatibility complex: a review. Ann. Hum. Genet. **65:** 1-26.
- Mikko S, K Roed, S Schmutz, L Andersson. 1999. Monomorphism and polymorphism at Mhc DRB loci in domestic and wild ruminants. Immunol. Rev. 167: 169-178.
- Miller HC, DM Lambert. 2004. Genetic drift outweighs balancing selection in shaping post-bottleneck major histocom-

patibility complex variation in New Zealand robins (Petroicidae). Mol. Ecol. **13:** 3709-3721.

- Murray BW, S Malik, BN White. 1995. Sequence variation at the major histocompatibility complex locus DQ beta in beluga whales (*Delphinapterus leucas*). Mol. Biol. Evol. 12: 582-593.
- Murray BW, BN White. 1998. Sequence variation at the major histocompatibility complex *DRB* loci in beluga (*Delphinapterus leucas*) and narwhal (*Monodon monoceros*). Immunogenetics **48**: 242-252.
- Nei M, T Gojobori. 1986. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. Mol. Biol. Evol. 3: 418-426.
- Perrin WF, JRL Brownell. 2001. Appendix 1 [of Annex U]. Update on the list of recognized species of cetaceans. J. Cet. Res. Manage. **3(Supplement):** 364-365.
- Pfau RS, RA Van Den Bussche, K McBee, RL Lochmiller. 1999. Allelic diversity at the Mhc-DQA locus in cotton rats (*Sigmodon hispidus*) and a comparison of *DQA* sequences within the family Muridae (Mammalia: Rodentia). Immunogenetics **49**: 886-893.
- Reeves RR, BD Smith, EA Crespo, G Notarbartolo di Sciara. 2003. Dolphins, whales and porpoises: 2002-2010 conservation action plan for the world's cetaceans. IUCN/SSC Cetacean Specialist Group. Gland, Switzerland and Cambridge, UK: IUCN.
- Robinson J, MJ Waller, P Parham, N de Groot, R Bontrop, LJ Kennedy, P Stoehr, SG Marsh. 2003. IMGT/HLA and IMGT/MHC: sequence databases for the study of the major histocompatibility complex. Nucleic Acids Res. **31**: 311-314.
- Schook L, S Lamont. 1996. The major histocompatibility complex region of domestic animal species. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Sommer S. 2003. Effects of habitat fragmentation and changes of dispersal behaviour after a recent population decline on the genetic variability of noncoding and coding DNA of a monogamous Malagasy rodent. Mol. Ecol. **12**: 2845-2851.
- Sommer S. 2005. The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology and conservation. Front. Zool. **2:** 16.
- Stern LJ, JH Brown, TS Jardetzky, JC Gorga, RG Urban, JL Strominger, DC Wiley. 1994. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an

influenza virus peptide. Nature 368: 215-221.

- Thompson JD, DG Higgins, TJ Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. **22:** 4673-4680.
- van der Walt JM, LH Nel, AR Hoelzel. 2001. Characterization of major histocompatibility complex *DRB* diversity in the endemic South African antelope *Damaliscus pygargus*: a comparison in two subspecies with different demographic histories. Mol. Ecol. **10**: 1679-1688.
- Wagner JL, RC Burnett, R Storb. 1999. Organization of the canine major histocompatibility complex: current perspectives. J. Hered. **90:** 35-38.
- Wang J, L Chou, B White. 2000a. Osteological differences between two sympatric forms of bottlenose dolphins (genus *Tursiops*) in Chinese waters. J. Zool. 252: 147-162.
- Wang J, L Chou, BN White. 2000b. Differences in the external morphology of two sympatric species of bottlenose dolphins (genus *Tursiops*) in the waters of China. J. Mammal. 81: 1157-1165.
- Wang JY, L Chou, BN White. 1999. Mitochondrial DNA analysis of sympatric morphotypes of bottlenose dolphins (genus: Tursiops) in Chinese waters. Mol. Ecol. 8: 1603-1612.
- Wang MC. 2003. Feeding habits, food resource partitioning and guild structure of odontocetes in Taiwanese waters. PhD dissertation, Taipei, Taiwan: National Taiwan Univ.
- Yang G, J Yan, K Zhou, F Wei. 2005. Sequence variation and gene duplication at MHC DQB loci of Baiji (*Lipotes vexillifer*), a Chinese river dolphin. J. Hered. **96:** 310-317.
- Yang H. 1976. Studies on the whales, porpoises and dolphins of Taiwan. Ann. Rep. Sci. 19: 131-178.
- Yuhki N, SJ O'Brien. 1990. DNA variation of the mammalian major histocompatibility complex reflects genomic diversity and population history. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 836-840.
- Yuhki N, SJ O'Brien. 1997. Nature and origin of polymorphism in feline MHC class II DRA and DRB genes. J. Immunol. 158: 2822-2833.
- Zhou K, W Qian. 1985. Distribution of the dolphins of the genus *Tursiops* in the China Seas. Aquat. Mamm. 1: 16-19.