

## PALEOGENÒMICA

CARLES LALUEZA-FOX

*Institut de Biologia Evolutiva (CSIC-UPF).*

Adreça per a la correspondència: Carles Lalueza-Fox. Institut de Biologia Evolutiva (CSIC-UPF). Dr. Aiguader, 88. 08003 Barcelona. Adreça electrònica: *carles.lalueza@upf.edu*.

### RESUM

Des que es va recuperar per primer cop DNA d'una espècie extingida, l'any 1984, la paleogenòmica ha experimentat una autèntica revolució, gràcies a les tècniques d'ultraseqüenciació desenvolupades en els dos darrers anys. Això ha permès per primer cop assolir projectes genòmics d'espècies extingides com els mamuts i els neandertals. Aquest treball fa un repàs històric dels principals estudis paleogenòmics i es discuteixen les possibles aplicacions, així com les problemàtiques metodològiques.

**Paraules clau:** evolució, metagenòmica, DNA antic, ultraseqüenciació.

### PALAEOGENOMICS

#### SUMMARY

Since the first DNA retrievals from an extinct species, in 1984, palaeogenomics has experienced a real revolution, thanks to the new ultrasequencing techniques developed in the last two years. These techniques have allowed the launching of genomic projects from extinct species such as mammoths and Neandertals. This work is an historical review of the main paleogenomic studies. Possible applications as well as methodological problems are also discussed.

**Key words:** evolution, metagenomics, ancient DNA, ultrasequencing.

#### INTRODUCCIÓ

En els darrers anys, l'estudi del material genètic de restes del passat, que s'havia anomenat *DNA antic* o *ancient DNA*, i que va tenir inicis molt modestos pel que

fa al volum d'informació genètica recuperada, ha entrat de ple en l'era de la paleogenòmica. S'entén per paleogenòmica l'estudi de la seqüència, estructura i funció dels genomes extingits, tant del genoma nuclear, que comprèn la immensa majoria del

missatge genètic d'un organisme, com dels genomes citoplasmàtics, és a dir, el genoma mitocondrial (mtDNA) i el genoma cloroplàstic (cpDNA, present només en vegetals) (Hofreiter, 2008). A causa del major nombre de còpies d'aquests genomes citoplasmàtics comparat amb el genoma nuclear (fins a diversos milers per només dues còpies del DNA nuclear), durant gairebé vint anys la recerca en DNA antic s'ha basat a recuperar fragments de mtDNA o cpDNA d'espècies extingides amb finalitats filogenètiques.

El primer estudi de DNA antic oficialment reconegut va tenir lloc el 1984, i va permetre la recuperació de dos fragments de mtDNA d'un tipus de zebra sud-africana extingida, el quagga, a partir d'un exemplar naturalitzat conservat al museu d'història natural de Mainz (Higuchi *et al.*, 1984). El procediment tècnic emprat era extraordinàriament ineficient a causa de la seva inespecificitat; els investigadors van extreure DNA a partir d'una mostra de teixit i el van clonar en bacteris emprant fags com a vectors de clonatge. Després van examinar milers de clons fins a trobar-ne dos que contenien mtDNA i que posteriorment van identificar com a seqüències d'èquid per hibridació amb DNA de zebra. Com que el DNA nuclear està molt més representat a la cèl·lula que l'mtDNA, ara sabem que per cada clon que conté una seqüència mitocondrial cal esperar que n'hi hagi entre quaranta i mil que contindran fragments de DNA nuclear. És a dir, encara que això no es va mirar mai, és més que probable que en el primer estudi de DNA antic ja tingués lloc una recuperació de tipus paleogenòmic. Però amb aquesta tècnica el DNA antic no hauria pogut desenvolupar-se, en part per la impossibilitat de replicar els resultats, ja que el clonatge no deixa de ser un mostreig genòmic a l'atzar. Només assolint elevades cobertures genòmiques —tècnicament i econòmicament inviables en aquell temps— podrí-

em esperar trobar diverses seqüències que cobrissin la mateixa regió.

El desenvolupament de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR), aplicada per primer cop el 1988 novament en la recuperació dels dos fragments ja estudiats de mtDNA del quagga, va permetre descobrir dos errors en les seqüències recuperades per clonatge, atribuïbles amb tota probabilitat a danys químics ocorreguts *post mortem* en el DNA original (Pääbo i Wilson, 1988). Però secundàriament, també va permetre l'aparició a gran escala d'aquest camp científic, que al cap d'uns anys, el 1997, va assolir una de les seves fites principals amb la primera recuperació de mtDNA d'una espècie humana extingida, els neandertals (Krings *et al.*, 1997).

## DEL DNA MITOCONDRIAL ALS GENS NUCLEARS

Cal remarcar que l'any 1999 un estudi va fer servir la PCR per recuperar alguns modestos fragments de DNA nuclear d'alguns mamífers plistocènics extingits: el mamut, el peresós gegant i l'ós de les caver-nes (Greenwood *et al.*, 1999). Tot i que les seqüències obtingudes no eren informatives des del punt de vista funcional o fenotípic, el principal interès de l'estudi va ser la demostració pràctica que no hi havia res, més enllà de la quantitat de DNA (es calcula que la proporció és d'u a mil), que impedís tècnicament accedir al genoma nuclear. Tot i que en la majoria de les mostres antigues només és possible recuperar fragments de mtDNA, en casos de conservació excepcionals, com la megafauna conservada en zones fredes, l'anàlisi específica de gens nuclears pot ser possible. En vegetals, un estudi fet l'any 2003 amb mostres de blat de moro d'alguns milers d'anys d'antiguitat, va permetre traçar un arrossegament selectiu en

un determinat gen associat al procés de domesticació (Jaenicke-Després *et al.*, 2003).

De fet, el primer gen nuclear sencer no es va recuperar fins a l'any 2006, a partir de mostres de mamut siberianes; es tracta d'un gen d'un sol exó de menys de mil nucleòtids, l'*MC1R* (receptor 1 de la melanocortina), que, a més a més, té un clar efecte fenotípic en el color del cabell o del pelatge. En el cas dels mamuts, va ser possible recuperar-lo per PCR mitjançant la superposició d'una vintena de fragments en dos laboratoris diferents; a més, es va portar a terme un estudi funcional per saber l'efecte fenotípic d'unes variants no descrites en el mateix gen en els elefants (Römpler *et al.*, 2006). Posteriorment, l'any 2007, es va fer el mateix amb un fragment del gen *MC1R* que presentava una variant específica en dues mostres de neandertals, la qual cosa va permetre confirmar una caiguda de funció de la proteïna resultant d'una intensitat similar a les variants que en humans moderns produeixen el fenotip pèl-roig (Lalueza-Fox *et al.*, 2007). Aquest tipus d'aproximació funcional marca sens dubte el futur dels estudis paleogenòmics, després de l'obtenció d'esborranys genòmics.

## LA MITOGENÒMICA

La PCR permet recuperar de manera específica fragments de DNA, i a partir d'una única o de poques còpies inicials poden generar-ne bilions de còpies, la qual cosa permet posteriorment obtenir-ne la seqüència. Les principals dificultats consisteixen a dissenyar encebadors que puguin unir-se eficientment al DNA endogen que es pretén recuperar (per la qual cosa es necessita disposar d'informació genètica d'espècies vives emparentades) i el fet que l'elevada fragmentació del DNA original implica treballar amb fragments molt curts, general-

ment entre cent i dos-cents nucleòtids de llargada. *A priori*, la quantitat d'encebadors necessaris i la dificultat de superposar nombrosos fragments són les úniques limitacions que impedeixen la recuperació de genomes mitocondrials sencers, que tenen una llargada d'uns 16.500 nucleòtids.

Això és va portar a terme per primer cop el 2001, amb la recuperació dels genomes mitocondrials sencers de dues espècies de moes, unes aus gegants de Nova Zelanda, emparentades amb els actuals kiwis, estruços, emús, casuaris i nyandús, i que es van extingir fa uns quatre-cents anys (Cooper *et al.*, 2001). L'aparició de la mitogenòmica va ser en part possible pel fet que la bona conservació del DNA va permetre recuperacions amb PCR de més de quatre-cents nucleòtids de llargada, però així i tot va requerir la superposició de gairebé vuitanta fragments diferents i de més d'un any de feina de laboratori. Una de les limitacions d'aquesta aproximació és la gran quantitat d'extracte requerit. La consecució del genoma mitocondrial dels moes va necessitar el processament d'uns quants grams d'os, un fet que hauria estat impossible si s'hagués tractat d'una resta única o molt petita.

Es va trigar cinc anys a aconseguir un nou genoma mitocondrial complet, i aquest cop van ser tres estudis diferents, tots publicats l'any 2006, que van completar el genoma mitocondrial de tres espècimens de mamut. Potser el més remarcable és que tots tres estudis van emprar aproximacions metodològiques diferents. En un es va fer servir l'aproximació «clàssica» de l'estudi dels moes, és a dir, el fet d'anar superposant amb paciència dotzenes de fragments recuperats amb la PCR (Rogaev *et al.*, 2006). En l'altre estudi, es van dissenyar dues PCR de tipus *multiplex* fetes amb dues passes (Krause *et al.*, 2006). En el primer pas de la PCR, es barregen una gran quantitat d'encebadors (dissenyats per amplificar la

meitat de tot el genoma mitocondrial, en fragments que no se superposin) a molt baixa concentració; el producte d'aquesta PCR es dilueix i cada fragment és amplificat de manera individual en una segona PCR generada a partir de la primera. Després, es fa una segona PCR *multiplex* amb els encebadors dissenyats per omplir els forats que hi ha entre la primera tanda d'encebadors. Cal fer notar que aquesta estratègia permet estalviar enormement el volum d'extracte. Si en l'aproximació clàssica es necessitaven vuitanta reaccions diferents de PCR, pel que fa al volum d'extracte emprat, l'aproximació de tipus *multiplex* equival només a dues reaccions de PCR. Finalment, el darrer estudi obtenia el genoma mitocondrial d'una manera completament nova i no basada en la PCR: es tractava d'una nova aproximació metagenòmica (i per tant, inespecífica) de tipus *shotgun* (Poinar *et al.*, 2006).

## SHOTGUN METAGENÒMIC

S'entén per una aproximació metagenòmica la seqüenciació una mostra en la qual no ha estat possible aïllar els organismes que la componen, per la qual cosa cada seqüència s'identifica posteriorment mitjançant bases de dades genètiques. Per exemple, estudis fets a partir d'aigua de mar són aproximacions metagenòmiques, i produeixen seqüències de bacteris, virus i microorganismes diversos barrejades. Les mostres òssies de fauna extingida contenen no solament el DNA d'aquell organisme quan estava viu, sinó també el DNA de bacteris del sòl, de fongs, etc., que viuen en el sediment o han colonitzat l'ós. Hi ha diverses metodologies metagenòmiques; l'enfocament emprat en l'estudi original del quagga, l'any 1984, podria considerar-se metagenòmic. De fet, l'any 2005, un grup va portar la tècnica de clonatge d'un extracte de DNA antic

en bacteris fins a l'extrem de produir vint-i-set mil nucleòtids del genoma de dues mostres d'ós de les caveres datades en fa uns quaranta mil anys. Bàsicament van processar grans mostres de quaranta grams d'ós i ho van concentrar en un petit volum, van modificar químicament els extrems de tot el DNA contingut en l'extracte final, es van dedicar a clonar-lo en bacteris i després es van seqüenciar milers de colònies (Noonan *et al.*, 2005). Aquesta tècnica és terriblement ineficaz; per obtenir 389 clons de la primera mostra amb DNA d'ós de les caveres, van haver de seqüenciar prop de deu mil clons. És a dir, l'eficiència estava prop de l'1 % (tot i que era una mica més alta per a la segona mostra, que arribava al 6 %). A més a més, l'anàlisi de milers de colònies és un procés difícil d'automatitzar, i tot plegat es fa difícil imaginar que amb aquesta tècnica es pugui recuperar mai un genoma sencer.

La tècnica del *shotgun* metagenòmic del tercer genoma mitocondrial de mamut havia estat desenvolupada feia pocs mesos i s'havia aplicat primer a la seqüenciació de genomes bacterians: la piroseqüenciació 454 de la companyia Life Sciences (Margulies *et al.*, 2005). Per començar el procés, es necessiten fragments curts de DNA de cadena doble i extrems roms. Com que el DNA antic ja està degradat, aquest primer pas de fragmentació no cal dur-lo a terme. Primer, se reparen els extrems, i s'estén l'extrem 3' (quan sobresurt el 5') o es retalla quan és el 3' el que sobresurt. Després s'afegeixen dos adaptadors (que són seqüències curtes específiques de cada projecte) a cada fragment de DNA, als extrems 3' i 5'; un dels adaptadors està biotinitat i això farà que s'uneixi a unes microesferes de polímer. Després es trenquen les dobles cadenes amb NaOH (darrerament s'ha vist que és més eficient fer-ho senzillament amb calor) i ens quedem amb una sola cadena de cada fragment inicial de DNA (les que es-

tan unides al polímer s'eliminen). A continuació, aquestes cadenes de DNA són amplificades en una PCR emulsionada, que consisteix en milions d'esferes de polímer microscòpiques que tenen la seva superfície recoberta per una seqüència complementària a un dels adaptadors. La PCR té lloc en un únic tub, on els reactius estan en solució aquosa i on s'afegeix oli, que queda emulsionat i envoltant cada microesfera, que té una sola cadena inicial de DNA. Al final de la reacció, s'obtenen centenars de milers de microesferes que estan literalment recobertes de milers de còpies de cadena única de cada fragment de DNA original. A continuació, tot això se centrifuga en una microplaca que té més d'un milió de pous que, pel seu diàmetre, únicament podran contenir una microesfera en el seu interior. Finalment, s'obté la seqüència del DNA de cada pou, partint des de l'adaptador extern, mitjançant una seqüenciació per síntesi (*sequencing by synthesis*, SBS) basada en una pirofosfatasa que, en presència d'una luciferasa, emet llum cada cop que un determinat nucleòtid s'afegeix a la cadena. Cada nucleòtid s'allibera de manera seqüencial (T, A, C, G, i de nou T, A, C, G, etc.); si un nucleòtid s'incorpora a la seqüència, la màquina detecta llum en aquell pou concret. D'aquesta manera és possible fer al voltant de 250.000 seqüències en una sola reacció (cada una pot arribar a uns cent nucleòtids, la qual cosa vol dir que es generen uns 20-30 milions de nucleòtids en poques hores). La nova generació de màquines de piroseqüenciació ha augmentat aquesta productivitat fins a uns cent milions, tant perquè han aconseguit allargar les seqüències fins a uns dos-cents nucleòtids (això és una mica irrellevant en DNA antic, ja que sol estar degradat a longituds inferiors), com perquè han augmentat el nombre de micropous per reacció. Una de les principals limitacions de la tècnica es dona

quan una seqüència presenta una repetició del mateix nucleòtid; en principi el feix de llum resultant ha de ser proporcionalment intens al nombre de nucleòtids incorporats, però en la pràctica es poden produir errors a partir de cinc nucleòtids idèntics.

Tornant al genoma mitocondrial del mamut, els investigadors van produir al voltant de setze milions de nucleòtids del genoma del mamut, la qual cosa constitueix una eficiència increïble del voltant del 50 % (Poinar *et al.*, 2006). La resta de seqüències obtingudes eren fongs, bacteris o simplement desconegudes (probablement, són bacteris no descrits perquè no poden créixer en plaques de cultiu). Com que aquesta mostra contenia al voltant de deu milions de còpies de DNA mitocondrial per cada gram d'os, indirectament, els investigadors van poder obtenir tot el genoma mitocondrial amb una gran cobertura genòmica. Amb unes quantes reaccions més, s'ha aconseguit completar el genoma nuclear sencer dels mamuts (encara sense publicar). Val a dir que es tracta de mostres antigues que tenen un caràcter excepcional, ja que han estat extretes de *permafrost* siberià (sol permanentment congelat per sota de la superfície), que conserva molt bé el DNA, i es van mantenir congelades fins a arribar al laboratori, la qual cosa va limitar enormement la colonització de l'os per part de microorganismes.

Estudis posteriors realitzats amb la mateixa tècnica, però a partir de pèls de mamut conservats en algunes carcasses, han mostrat també eficiències força altes (sembla que l'estructura empaquetada i queratinitzada, altament hidròfoba, del cabell, impedeix la proliferació de microorganismes) i la possibilitat d'obtenir genomes mitocondrials amb cobertures genòmiques de quaranta amb una sola reacció de piroseqüenciació 454.

## EL PROJECTE GENOMA NEANDERTAL

Amb les tècniques d'ultraseqüenciació com la piroseqüenciació 454 és possible, per primer cop des que existeixen els estudis paleogenètics, afrontar projectes de recuperació de genomes sencers d'espècies extingides. El més ambiciós d'aquests projectes, i el més complicat tècnicament, és el Projecte Genoma Neandertal, endegat l'any 2006 pel director del Departament de Genètica Evolutiva de l'Institut Max Planck de Leipzig, Svante Pääbo, amb un consorci amb la companyia 454 Life Sciences. El projecte ha finalitzat oficialment el 12 de febrer de 2009, amb l'obtenció d'un esborrany genòmic força complet (les regions repetitives no es podran recuperar mai) d'un neandertal, una espècie humana que va viure a Europa fa entre 400.000 i uns 28.000 anys, quan es van extingir els darrers, després de l'entrada a Europa dels nostres avantpassats provinents d'Àfrica. Per portar a terme aquest projecte hi ha algunes dificultats afegides. Primer, quan es treballa amb mostres de l'Europa temperada, com les que es fan servir en el Projecte Genoma Neandertal, les eficiències obtingudes no s'acosten mai a les del mamut. En l'estudi pilot, portat a terme amb la mostra Vi33.16 del jaciment croata de Vindija, només un 6 % de les seqüències obtingudes eren de tipus humà (Green *et al.*, 2006; Noonan *et al.*, 2006). Posteriorment, es va determinar que hi havia una contaminació amb DNA humà modern que estava al voltant d'un 30-50 % (segons algunes estimacions), la qual cosa baixaria el percentatge una mica més, fins al 3-4 %. Això és força coherent amb posteriors reaccions amb mostres de Vindija, que gairebé sempre han donat valors entre el 2 i el 4 %. Les mostres de El Sidrón (un jaciment asturià datat de fa uns 43.000 anys) només han arribat a eficiències del 0,1 %. L'extrema

ineficiència de les mostres de neandertals ha significat només que s'ha hagut d'augmentar la capacitat de seqüenciació. A partir del mes de juny de l'any 2008, la companyia Life Sciences ha posat totes les seves màquines de piroseqüenciació 454 a disposició del projecte.

Però el problema principal del Projecte Neandertal és un altre: la contaminació de les mostres amb DNA humà modern i la impossibilitat de distingir gran part d'aquestes seqüències contaminants de les endògenes. Totes les mostres antigues excavades, tocades i netejades, tenen un cert grau de contaminació del DNA dels investigadors (normalment arqueòlegs) que han realitzat aquestes tasques. Tant els ossos com les dents són permeables i permeten l'entrada de DNA a l'interior dels teixits, especialment en presència d'aigua. Per exemple, en un estudi preliminar de piroseqüenciació 454 portat a terme amb el càprid extingit de les illes Balears *Myotragus balearicus*, i recuperat sense guants pels excavadors, hi ha al voltant d'un 1 % de seqüències humanes contaminants, tantes com seqüències de bòvid i, per tant, endògenes. Tot això no constitueix òbviament un problema quan es treballa amb altres espècies com mamuts o ossos de les caveres, ja que les seqüències humanes són prou diferents i poden ser distingides, però cal recordar que neandertals i humans moderns deuen ser idèntics en potser un 99,5 % del genoma. Una possibilitat que hem assajat al jaciment de El Sidrón és la de controlar *a priori* la contaminació, extraient les mostres amb vestits de laboratori estèrils, congelant-les immediatament i també genotipant les persones involucrades en l'excavació. En algunes mostres de neandertals ha estat possible demostrar, mitjançant l'amplificació amb PCR de fragments de DNA mitocondrial, que la contaminació humana és molt petita, entre un 10 i un 15 %. Les mostres de Vindija tenen un

grau similar de contaminació per un fenomen d'atzar: quan es va excavar el jaciment, l'any 1980, alguns fragments ossis eren tan petits que van ser confosos amb els d'ós de les caveres i van ser desats en un calaix a part, on ningú no els va estudiar. És remarcable també que els individus dels dos jaciments (que ara mateix són els jaciments amb les restes que conserven més DNA d'Europa) van ser víctimes del canibalisme. Podria ser que això, secundàriament, hagués evitat una major degradació del DNA per una menor intervenció de bacteris associats a la descomposició dels teixits tous. En tot cas, el genoma de neandertal serà una espècie de genoma probabilístic, en què no serà possible descartar una contaminació humana residual en alguns punts. Per això en el futur s'hauran de portar a terme projectes de diversitat genòmica neandertal, o fins i tot intentar l'anàlisi d'algunes restes d'hominins anteriors, com els *Homo erectus* que es trobin dins el rang temporal d'unes desenes de milers d'anys.

## PERSPECTIVES I PROBLEMES

Les noves tècniques d'ultraseqüenciació, no solament la versió millorada de la piroseqüenciació, sinó també les noves plataformes de Solexa-Illumina i d'Applied Biosystems (Solid), permeten l'assoliment de genomes sencers d'espècies extingides, fins i tot en el cas d'ambients relativament temperats com Europa i amb eficiències de recuperació tan baixes com un 10 % o menys. Les limitacions de conservació del DNA antic fan que això només sigui possible dins un rang temporal de poques desenes de milers d'anys, suficient, però, per posar a l'abast nostre un gran nombre d'espècies extingides, especialment megafauna, a Euràsia, Amèrica i Austràlia (i també, és clar, per estudiar els avantpassats de les espècies

domesticades i veure quins gens han estat seleccionats artificialment pels humans des del neolític). Tot això haurà d'anar acompanyat d'un coneixement genòmic profund de les espècies actuals que hi estan emparentades; per exemple, l'obtenció del genoma del mamut ha posat de manifest que, per conèixer quins gens poden estar implicats en trets propis dels mamuts com el pelatge llarg (els elefants actuals gairebé no tenen pèl), s'ha de disposar també del genoma de l'elefant africà i asiàtic. Com en altres vegades en paleogenètica, sorprèn que sigui possible acabar primer un genoma extingit que no els dels éssers que encara estan vius (això també va passar quan es va aconseguir el genoma mitocondrial sencer dels moes, ja que a continuació es va haver de seqüenciar el genoma del casuari, del kiwi, del nyandú i de l'estruc).

Un problema dels estudis de tipus *shotgun* és que és impossible distingir quines substitucions nucleotídiques són degudes a canvis evolutius en el llinatge que s'està estudiant i quines a danys químics *post mortem* del DNA original. La immensa majoria d'aquests danys són canvis deguts a desaminacions de citosines a uracils, que queden en la seqüència final com a falsos canvis de citosines a timines (o de guanines a adenines si la desaminació de la citosina s'ha donat en la cadena oposada). Per exemple, els arbres filogenètics portats a terme amb les seqüències *shotgun* de neandertals i de mamuts sempre mostren branques anormalment llargues per a l'espècie extingida comparada amb les espècies actuals emparentades; quan s'han suprimit els canvis C-T i G-A, aquest artefacte desapareix de l'arbre. Per aconseguir esbrinar quins canvis són reals i quins són danys *post mortem*, s'haurà de recuperar específicament cada un (p. ex., amb centenars de PCR multiplexades) i repetir-ho diverses vegades per als casos que puguin ser heterozigots per a de-

terminades variants. Això pot ser una feina gegantina perquè, per exemple, entre neandertals i humans moderns s'esperen trobar entre un i quatre milions de diferències (és clar que només aquelles que es trobessin en exons tindrien interès evolutiu). Alternativament, no caldria fer-ho si s'aconseguissin cobertures genòmiques entre vint i cent (o almenys més de dotze), quelcom que sembla tècnicament i econòmicament inviable, excepte en el cas del genoma mitocondrial.

Finalment, aconseguir un esborrany genòmic és un primer pas, però per entendre què volen dir els canvis trobats en els diferents gens a escala evolutiva, s'hauran de fer desenes d'estudis funcionals, semblants als que ja s'han fet per al gen de la pigmentació en mamuts i neandertals. La genòmica funcional, ja sigui en estudis *in vitro* o a partir de models animals (en el cas del genoma de neandertal, és evident que s'hauran de «neandertalitzar» ratolins) serà el següent pas en els futurs estudis paleogenòmics i marcarà un nou horitzó en el coneixement dels processos evolutius passats.

## BIBLIOGRAFIA

- COOPER, A.; LALUEZA-FOX, C.; ANDERSON, S.; RAMBAUT, A.; AUSTIN, J.; WARD, R. (2001). «Complete mitochondrial genome sequences of two extinct moas clarify ratite evolution». *Nature*, 409: 704-707.
- GREEN, R. E.; KRAUSE, J.; PTAK, S. E.; BRIGGS, A. W.; ROONAN, M. T.; SIMONS, J. F.; DU, L.; EGHOLM, M.; ROTHBERG, J. M.; PAUNOVIC, M.; PÄÄBO, S. (2006). «Analysis of one million base pairs of Neanderthal DNA». *Nature*, 444: 330-336.
- GREENWOOD, A. D.; CAPELLI, C.; POSSNERT, G.; PÄÄBO, S. (1999). «Nuclear DNA sequences from late Pleistocene megafauna». *Mol. Biol. Evol.*, 16: 1466-1473.
- HIGUCHI, R.; BOWMAN, B.; FREIBERGER, M.; RYDER, O. A.; WILSON, A. C. (1984). «DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family». *Nature*, 312: 282-284.
- HOFREITER, M. (2008). «Paleogenomics». *C. R. Palevol.*, 7: 113-124.
- JAENICKE-DESPRÉS, V.; BUCKLER, E. S.; SMITH, B. D.; GILBERT, M. T.; COOPER, A.; DOEBLEY, J.; PÄÄBO, S. (2003). «Early allelic selection in maize as revealed by ancient DNA». *Science*, 302: 1206-1208.
- KRAUSE, J.; DEAR, P. H.; POLLACK, J. L.; SLATKIN, M.; SPRIGGS, H.; BARNES, I.; LISTER, A. M.; EBERSBERGER, I.; PÄÄBO, S.; HOFREITER, M. (2006). «Multiplex amplification of the mammoth mitochondrial genome and the evolution of Elephantidae». *Nature*, 439: 724-727.
- KRINGS, M.; STONE, A.; SCHMITZ, R. W.; KRAINITZKI, H.; STONEKING, M.; PÄÄBO, S. (1997). «Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans». *Cell*, 90: 19-30.
- LALUEZA-FOX, C.; GIGLI, E.; RASILLA, M. DE LA; FORTEA, J.; ROSAS, A.; BERTRANPETIT, J.; KRAUSE, J. (2008). «Genetic characterization of the ABO blood group in Neandertals». *BMC Evolutionary Biology*, 8: 342.
- LALUEZA-FOX, C.; RÖMPLER, H.; CARAMELLI, D. [et al.] (2007). «A melanocortin 1 receptor allele suggests varying pigmentation among Neanderthals». *Science*, 318: 1453-1455.
- MARGULIES, M.; EGHOLM, M.; ALTMAN, W. E. [et al.] (2005). «Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors». *Nature*, 437: 376-380.
- NOONAN, J. P.; COOP, G.; KUDARAVALLI, S.; SMITH, D.; KRAUSE, J.; ALESSI, J.; CHEN, F.; PLATT, D.; PÄÄBO, S.; PRITCHARD, J. K.; RUBIN, E. M. (2006). «Sequencing and analysis of neanderthal genomic DNA». *Science*, 314: 1113-1118.
- NOONAN, J. P.; HOFREITER, M.; SMITH, D.; PRIEST, J. R.; ROHLAND, N.; RABEDER, G.; KRAUSE, J.; DETTER, J. C.; PÄÄBO, S.; RUBIN, E. M. (2005). «Genomic sequencing of Pleistocene cave bears». *Science*, 309: 597-599.
- PÄÄBO, S.; WILSON, A. C. (1988). «Polymerase chain reaction reveals cloning artefacts». *Nature*, 334: 387-388.
- POINAR, H. N.; SCHWARZ, C.; QI, J.; SHAPIRO, B.; MACPHEE, R. D.; BUIGUES, B.; TIKHONOV, A.; HUSON, D. H.; TOMSHO, L. P.; AUCH, A.; RAMPP, M.; MILLER, W.; SCHUSTER, S. C. (2006). «Metagenomics to paleogenomics: large-scale sequencing of mammoth DNA». *Science*, 311: 392-394.
- ROGAEV, E. I.; MOLIAKA, Y. K.; MALYARCHUK, B. A.; KONDRASHOV, F. A.; DERENKO, M. V.; CHUMAKOV, I.; GRIGORENKO, A. P. (2006). «Complete mitochondrial genome and phylogeny of Pleistocene mammoth *Mammuthus primigenius*». *PLoS Biol.*, 4: e73.
- RÖMPLER, H.; ROHLAND, N.; LALUEZA-FOX, C.; WILLERSLEV, E.; KUZNETSOVA, T.; RABEDER, G.; BERTRANPETIT, J.; SCHÖNEBERG, T.; HOFREITER, M. (2006). «Nuclear gene indicates coat-color polymorphism in mammoths». *Science*, 313: 62.