

## Secuenciación de ARN antiguo en bioarqueología - Revisión

Gabriel Dorado <sup>1</sup>, Fernando Luque <sup>2</sup>, Plácido Pascual <sup>3</sup>, Inmaculada Jiménez <sup>4</sup>, Francisco Javier S. Sánchez-Cañete <sup>5</sup>, Margarita Pérez-Jiménez <sup>1</sup>, Patricia Raya <sup>6</sup>, Jesús Sáiz <sup>7</sup>, Adela Sánchez <sup>7</sup>, Jesús Martín <sup>8</sup>, Teresa E. Rosales <sup>9</sup>, Víctor F. Vásquez <sup>10</sup>, Pilar Hernández <sup>11</sup>

<sup>1</sup> Autor para correspondencia, Dep. Bioquímica y Biología Molecular, Campus Rabanales C6-1-E17, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (ceiA3), Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba (Spain), CE: <bb1dopeg@uco.es>; <sup>2</sup> Laboratorio de Producción y Sanidad Animal de Córdoba, Ctra. Madrid-Cádiz km 395, 14071 Córdoba; <sup>3</sup> Laboratorio Agroalimentario de Córdoba, Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía, 14004 Córdoba; <sup>4</sup> IES Puertas del Campo, Avda. San Juan de Dios 1, 51001 Ceuta; <sup>5</sup> EE.PP. Sagrada Familia de Baena, Avda. Padre Villoslada 22, 14850 Baena (Córdoba); <sup>6</sup> Jefe de Servicio de Protección Radiológica, Colonia San José Nº 4 Planta 2a, Campus Rabanales, Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba; <sup>7</sup> Dep. Farmacología, Toxicología y Medicina Legal y Forense, Facultad de Medicina, Avda. Menéndez Pidal, s/n, Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba; <sup>8</sup> Dep. Microbiología, Campus Rabanales C6-B-O, Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba; <sup>9</sup> Centro de Investigaciones Arqueobiológicas y Paleoecológicas Andinas Arqueobios, Apartado Postal 595, Trujillo (Peru); <sup>10</sup> Centro de Investigaciones Arqueobiológicas y Paleoecológicas Andinas Arqueobios, Apartado Postal 595, Trujillo (Peru); <sup>11</sup> Instituto de Agricultura Sostenible (IAS), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Alameda del Obispo s/n, 14080 Córdoba

### Resumen

La secuenciación de primera generación (FGS; del inglés, “First-Generation Sequencing”) revolucionó la biología molecular en general, y la bioarqueología en particular. Ello permitió estudiar restos de ADN antiguo (ADNa) por primera vez. La secuenciación de segunda generación (SGS; del inglés, “Second-Generation Sequencing”) mejoró aún más el rendimiento, reduciendo el tiempo y coste por base nucleotídica secuenciada. Además, permitió secuenciar genomas antiguos completos, como los de neandertales. La secuenciación de tercera generación (TGS; del inglés, “Third-Generation Sequencing”) mejoró aún más el rendimiento de SGS, permitiendo además secuenciar moléculas individuales, sin requerir pasos previos de amplificación o modificación. Ello es revolucionario, evitando posibles sesgos asociados a tales pasos previos. Esto abre la puerta para la secuenciación directa verdadera del ARN [sin retrotranscripción en ADN complementario (ADNc)], incluyendo ARN antiguo (ARNa). Diferentes plataformas de TGS están surgiendo, prometiendo nuevos y emocionante descubrimientos en bioarqueología, tanto para ADNa como ARNa.

**Palabras clave:** genómica funcional, epigenética, ARN mensajero, transcriptomas antiguos, paleotranscriptómica.

### Abstract

First-Generation Sequencing (FGS) revolutionized molecular biology in general, and bioarchaeology in particular. That allowed to study ancient DNA (aDNA) remains for the first time. Second-Generation Sequencing (SGS) further improved throughput, reducing time and cost per sequenced nucleotide base. Most importantly, it allowed to sequence full ancient-genomes, like the ones of Neanderthals. Third-Generation Sequencing (TGS) improved even more SGS throughput, also allowing to sequence single molecules, without requiring previous amplification or modification steps. That is revolutionary, overcoming putative biases associated to such steps. This opens the door for true-direct RNA sequencing [without retrotranscription into complementary DNA (cDNA)], including ancient RNA (aRNA). Different TGS platforms are arising, promising exciting new discoveries on bioarchaeology for both aDNA and aRNA.

**Key words:** functional genomics, epigenetics, messenger RNA, ancient transcriptomes, paleotranscriptomics.

## Introducción

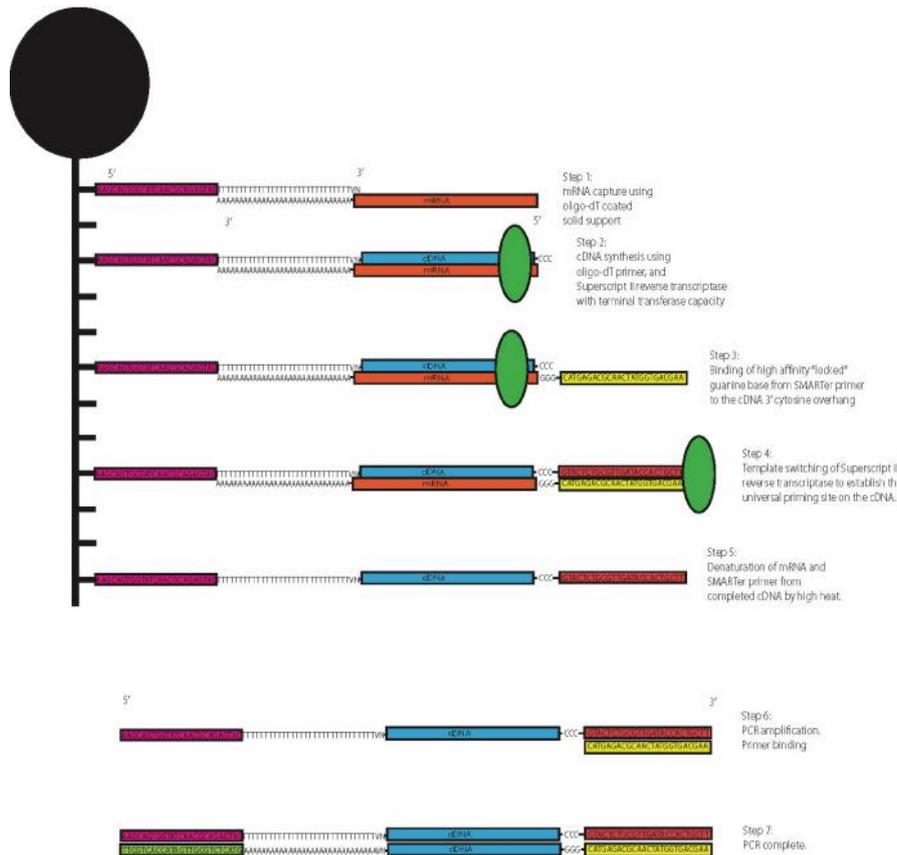
La secuenciación de primera generación (FGS; del inglés, “First-Generation Sequencing”) revolucionó la bioarqueología, permitiendo secuenciar ADN antiguo (ADNa). El avance se extendió a genomas antiguos con la secuenciación de segunda generación (SGS; del inglés, “Second-Generation Sequencing”), que logra un mayor rendimiento, de manera más rápida y a costo más reducido por base nucleotídica leída. Entre otros, incluyó la secuenciación del genoma neandertal (Green et al. 2006; Noonan et al. 2006; Dorado et al. 2007-2015). La secuenciación de tercera generación (TGS; del inglés, “Third-Generation Sequencing”) mejora aún más las metodologías anteriores, lo que permite secuenciar una sola molécula sin previa modificación o amplificación, se generan lecturas más largas (kilobases; kb). Estos avances evitan sesgos asociados a estrategias previas, aumentando aún más la productividad, reduciendo el tiempo y costo (Bleidorn 2015). Por lo tanto, SGS y TGS se consideran tecnologías de secuenciación de alto rendimiento (HTS; del inglés, “High-Throughput Sequencing”), siendo a veces denominadas con el término ambiguo “próxima generación” de secuenciación (NGS; del inglés, “Next-Generation Sequencing”). Además, estos métodos también pueden aplicarse para estudiar la epigenética del ADN, incluyendo ADNa (Gokhman et al. 2014; Pedersen et al. 2014; Orlando et al. 2015; Seguin-Orlando et al. 2015; Smith et al. 2015).

Además de ADNa, también sería interesante secuenciar ARN antiguo (ARNa), permitiendo tomar instantáneas de tejidos particulares en tiempos antiguos. Sin embargo, el ARN es más lábil que el ADN, y por lo general se degrada después del cese de la actividad fisiológica de soporte vital. Se sabe que el ADNa suele ser escaso, estar roto físicamente (degradado), pudiendo estar también modificado químicamente. De hecho, el ADNa puede ser difícil de aislar y secuenciar, siendo propenso a generar resultados positivos falsos, debido a contaminación con ADN moderno. Por lo tanto, se espera que ARNa sea más difícil de aislar y secuenciar, aunque el ARN mensajero (ARNm) es mucho más corto que el ADN genómico, lo que ciertamente es una ventaja para la secuenciación. Pero, ¿es posible secuenciar realmente ARN antiguo? La respuesta es sí –hasta cierto punto, por ahora– como se describe a continuación (Fordyce et al. 2013; Guy 2013, 2014; Ng et al. 2014; Smith et al. 2014).

## Secuenciación de RNA antiguo

Hay dos posibilidades para la secuenciación de ARN: retrotranscripción y secuenciación directa. La primera opción se puede lograr con FGS y SGS, para generar ADN complementario (ADNc) (Fig. 1) y posterior secuenciación. Dicha metodología se conoce a veces con el nombre engañoso de ARN-seq, en lugar del término más adecuado de ADNc-seq. Así, se han secuenciado diferentes ARNa (Guy et al. 2014), incluyendo el ARN del viroide del mosaico latente del melocotón de hace 50 años (Guy 2013), el virus-1 críptico del trébol blanco (Guy y Gerard 2016), genomas virales de hace 700 años a partir de las heces de caribú (Ng et al. 2014) y el virus del mosaico rayado de la cebada de 750 años (Smith et al. 2014). Incluso el transcriptoma de granos de maíz

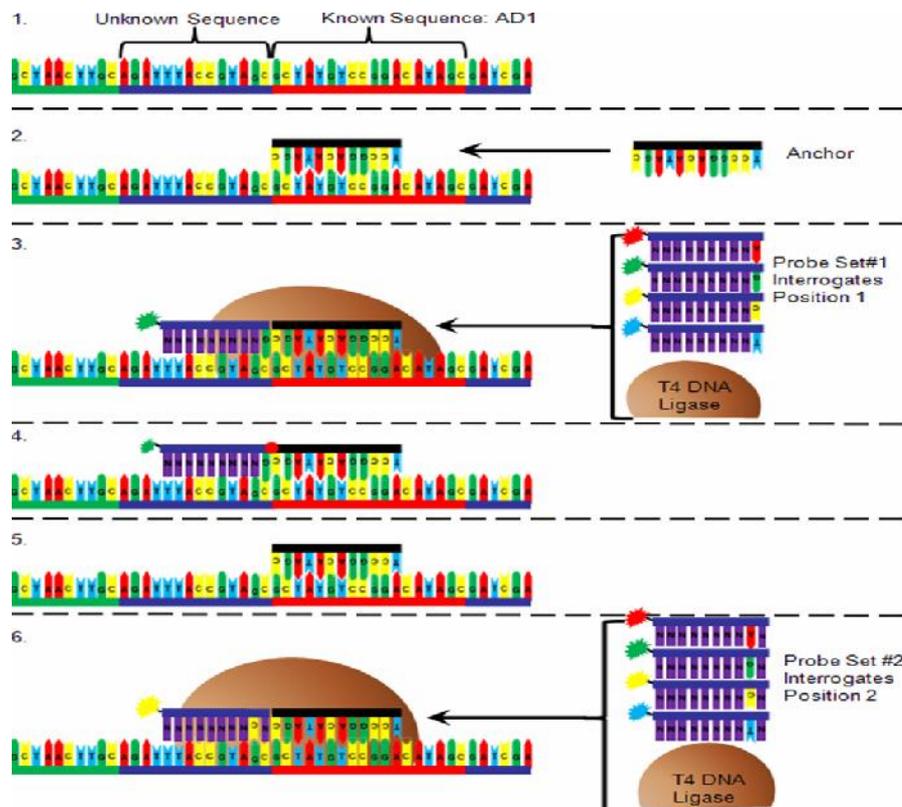
antiguos (723 años) ha sido secuenciado (Fordyce et al. 2013). Curiosamente, ya que los retrovirus se insertan en el genoma del hospedador como retrovirus endógenos (ERV; del inglés, “Endogenous RetroViruses”), su presencia se ha detectado también con la secuenciación de genomas modernos, así como de antiguos, como en el caso de coprolitos de 1.400 años de antigüedad (Rivera-Pérez et al. 2015). Obviamente, en este último caso, la retrotranscripción se llevó a cabo en la célula viva, pero se indica aquí como una curiosidad de investigación.



**Figura N° 1: Retrotranscripción de ARN en ADNc.** Ejemplo de retrotranscripción, en el que el ARN es capturado con perlas paramagnéticas (bola negra en la parte superior izquierda) y retrotranscrito a ADNc. La actividad transferasa-terminal de la retrotranscriptasa utilizada permite generar colas CC para así hibridar adaptadores de cadena simple, que se convierten en adaptadores de doble hebra tras la polimerización. El híbrido ARN-ADNc se desnaturaliza, lo que permite amplificar la primera cadena de ADNc en ADN de doble cadena, a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés. “Polymerase Chain Reaction”). © 2016 Danandmike, Wikimedia Commons <<http://commons.wikimedia.org>> y Creative Commons <<http://creativecommons.org>>.

Afortunadamente, TGS permite secuenciar directamente ácidos nucleicos, como se ha indicado antes, sin pasos previos de retrotranscripción o amplificación, abriendo la puerta para secuenciar realmente ARN en general, así como ARN en particular. Entre ellos se encuentran: i) secuenciación real de una sola molécula (tSMS; del inglés “true Single-Molecule Sequencing”) de Helicos BioSciences <<http://www.helicosbio.com>>, basado en la secuenciación mediante síntesis (SbS; del inglés, “Sequencing-by-Synthesis”). Fue la primera tecnología de secuenciación de una sola molécula disponible, siendo más adelante ofrecida como servicio por la empresa “Sequence the Lower Limit” (SeqLL) <<http://seqll.com>> (Harris et al. 2008); ii) secuenciación en tiempo real

de una sola molécula (SMRT; del inglés, “Single-Molecule Real-Time”) de Pacific Biosciences (PacBio) <<http://www.pacb.com>>, procedente de la antigua Nanofluidics <<http://nanofluidics.com>>, a través de SbS; iii) secuenciación mediante ligación de sonda-ancla combinatoria (cPAL; del inglés, “combinatorial Probe-Anchor Ligation”) de Complete Genomics <<http://www.completegenomics.com>>, basada en secuenciación mediante hibridación (SbH; del inglés, “Sequencing by Hybridization”) y secuenciación mediante ligación (SbL; del inglés, “Sequencing by Ligation”), ofrecida como servicio por AllSeq <<http://allseq.com>> (Fig. 2); y iv) secuenciación de Oxford Nanopore Technologies <<http://nanoporetech.com>>, basada en alteraciones de corrientes iónicas (eléctricas), al pasar los nucleótidos a través de nanoporos biológicos o sintéticos de estado sólido. Genera lecturas largas de 230 a 300 kb, a una velocidad de 280 a 500 bases por segundo (bps). Curiosamente, un equipo miniaturizado de secuenciador de mano MinION Mk 1B (87 g de peso) ha sido utilizado con éxito por la National Aeronautics and Space Administration (NASA) <<https://www.nasa.gov>> para astrobiología. Tiene un emocionante potencial para el diagnóstico de enfermedades de la tripulación e investigación de vida basada en ácidos nucleicos (Rezzonico 2014; John et al. 2016).



**Figura N° 2. Secuenciación de una sola molécula.** Ejemplo de TGS (cPAL), en la que un oligonucleótido de anclaje hibrida con una región conocida de la molécula que va a ser secuenciada. Además, una sonda de interrogación fluorescente (que contiene una base nitrogenada A, C, G o T en la posición de interrogación) se hibrida y se liga al ancla. Las sondas no hibridadas se eliminan y la fluorescencia de las unidades es detectada. El proceso se repite para el resto de los nucleótidos de interrogación. A continuación, se retira la sonda-ancla y el proceso se repite para otras sondas-anclas, hasta que se secuencia el ácido nucleico diana. © 2016 Suspencewl, Wikimedia Commons <<http://commons.wikimedia.org>> y Creative Commons <<http://creativecommons.org>>.

TGS se ha utilizado para secuenciar no sólo ADN, sino también ARN mediante secuenciación directa (DRS; del inglés, “Direct RNA Sequencing”) (Ozsolak et al. 2009). También se ha utilizado para secuenciar genomas antiguos, como el de caballo del Pleistoceno (Orlando et al. 2011; Ginolhac et al. 2012; Schubert et al. 2012).

### **Perspectivas futuras y conclusiones finales**

TGS es ahora un área activa de investigación y desarrollo, con prometedoras nuevas tecnologías en desarrollo, incluyendo las siguientes (por orden alfabético de fabricante): i) Electron Optica <<http://www.electronoptica.com>>, basada en microscopía electrónica de baja energía (LEEM; del inglés, “Low-Energy Electron Microscopy”); ii) Electronic BioSciences <<http://electronicbio.com>>, basada en la secuenciación mediante nanoporos; iii) secuenciador Gene Electronic Nano-Integrated Ultra-Sensitive (GENIUS) de GenapSys <<http://www.genapsys.com>>, capaz de medir tanto los cambios de pH como la temperatura durante la síntesis de ácidos nucleicos; iv) Genia <<http://www.geniachip.com>>, comprada en 2014 por Roche <<http://sequencing.roche.com>>, basada en SbS a través de nanoetiquetas de polietilenglicol (PEG; del inglés, “PolyEthylene Glycol”) en sensores activos analógico-a-digital; v) GnuBIO <<http://gnubio.com>>, que pertenece a Bio-Rad <<http://www.bio-rad.com>> desde 2014, basada en hexámeros SbH en nanogotas, prometiendo carreras sin errores (exactitud del 100%) tras filtrado de datos, en tan sólo ~3’5 h; vi) secuenciador de IBM <<http://www-03.ibm.com/ibm/history/ibm100/us/en/icons/dnatransistor>>, basado en nanoporos de estado sólido tipo transistor de ADN (del inglés, “DNA Transistor”); vii) LaserGen <<http://lasergen.com>>, usando terminadores relámpago (del inglés, “Lightning Terminators”), basados en colorantes fotoescindibles y grupos de terminación (Wu et al. 2007); viii) Solametrix <<http://www.solametrix.com>>, que se convirtió en Lightspeed Genomics <<http://www.lsgen.com>>, basada en el óptica de apertura sintética sub-píxel (SAO; del inglés, “Synthetic Aperture Optics”) con sensores LightSpeed, lo que permite la miniaturización 4x y ahorro de reactivos 16x; ix) NABsys <<http://nabsys.com>>, basada en sondas de hexámeros y SbS con nanoporos de estado sólido, mostrando una velocidad asombrosa de más de un millón de bps (~100.000 bps por detector), lo que permite secuenciar los ~3 mega pares de bases (Mpb) del genoma humano con profundidad de 25 veces por 100 dólares, en menos de una hora; y x) nanoporo óptico Optipore de NobleGen Biosciences <<http://noblegenbio.com>>, utilizando balizas moleculares fluorescentes y conversión de ADN circular (CDC; del inglés, “Circular DNA Conversion”), para convertir el ácido nucleico diana en una representación sintética expandida (ESR; del inglés, “Expanded Synthetic Representation”) de cadena de oligonucleótido (McNally et al. 2010).

La viabilidad de la secuenciación directa del ARN ha sido demostrada (Ozsolak et al., 2009), aunque falta por determinar el límite de edad del ARN para poder ser secuenciado, como se ha hecho anteriormente para ADN (Allentoft et al. 2012; Millar y Lambert 2013). La posibilidad de secuenciar transcriptomas antiguos (paleotranscriptómica) es sin duda emocionante, sobre todo cuando se utiliza TGS. De hecho, las lecturas directas y largas de las

nuevas plataformas de TGS (como las que utilizan nanoporos) vienen bien para tal objetivo. Sin embargo, pueden ser también necesarios algoritmos de ensamblaje especiales para ARNa (como en el caso de ADNa), ya que este material se encuentra generalmente degradado, como se señaló anteriormente. Además, será necesario aumentar la potencia de computación, a fin de poder analizar y comparar los datos de genómica, transcriptómica y proteómica, que crecen de manera exponencial.

**Agradecimientos.** Financiado por Ministerio de Economía y Competitividad (proyectos MINECO AGL2010-17316, BIO2011-15237-E y BIO2015-64737-R) e Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (MINECO e INIA RF2012-00002-C02-02); Consejería de Agricultura y Pesca (041/C/2007, 75/C/2009 y 56/C/2010), Consejería de Economía, Innovación y Ciencia (P11-AGR-7322 y P12-AGR-0482) y Grupo PAI (AGR-248) de Junta de Andalucía; y Universidad de Córdoba (Ayuda a Grupos), Spain.

## Referencias

- Allentoft ME, Collins M, Harker D, Haile J, Oskam CL, Hale ML, Campos PF, Samaniego JA, Gilbert MT, Willerslev E, Zhang G, Scofield RP, Holdaway RN, Bunce M (2012): The half-life of DNA in bone: measuring decay kinetics in 158 dated fossils. *Proc Biol Sci* 279: 4724-4733.
- Bleidorn C (2015): Third generation sequencing: technology and its potential impact on evolutionary biodiversity research. *Systematics and Biodiversity* 14: 1-8.
- Dorado G, Jiménez I, Rey I, Sánchez-Cañete FJS, Luque F, Morales A, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Rosales TE, Vásquez VF, Hernández P (2013): Genomics and proteomics in bioarchaeology - Review. *Archaeobios* 7: 47-63.
- Dorado G, Luque F, Pascual P, Jiménez I, Sánchez-Cañete FJS, Pérez-Jiménez M, Raya P, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Rosales TE, Vásquez VF, Hernández P (2015): Second-generation nucleic-acid sequencing and bioarchaeology - Review. *Archaeobios* 9: 216-230.
- Dorado G, Rey I, Rosales TE, Sánchez-Cañete FJS, Luque F, Jiménez I, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Vásquez VF (2009): Ancient DNA to decipher the domestication of dog (REVIEW). *Archaeobios* 3: 127-132.
- Dorado G, Rey I, Rosales TE, Sánchez-Cañete FJS, Luque F, Jiménez I, Morales A, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Hernández P, Vásquez VF (2010): Biological mass extinctions on planet Earth (REVIEW). *Archaeobios* 4: 53-64.
- Dorado G, Rosales TE, Luque F, Sánchez-Cañete FJS, Rey I, Jiménez I, Morales A, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Vásquez VF, Hernández P (2011): Ancient nucleic acids from maize - A review. *Archaeobios* 5: 21-28.
- Dorado G, Rosales TE, Luque F, Sánchez-Cañete FJS, Rey I, Jiménez I, Morales A, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Vásquez VF, Hernández P (2012): Isotopes in bioarchaeology - Review. *Archaeobios* 6: 79-91.

- Dorado G, Sánchez-Cañete FJS, Pascual P, Jiménez I, Luque F, Pérez-Jiménez M, Raya P, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Rosales TE, Vásquez VF, Hernández P (2014): Starch genomics and bioarchaeology - Review. *Archaeobios* 8: 41-50.
- Dorado G, Vásquez V, Rey I, Luque F, Jiménez I, Morales A, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Hernández P (2008): Sequencing ancient and modern genomes (REVIEW). *Archaeobios* 2: 75-80.
- Dorado G, Vásquez V, Rey I, Vega JL (2007): Archaeology meets Molecular Biology (REVIEW). *Archaeobios* 1: 1-2.
- Fordyce SL, Ávila-Arcos MC, Rasmussen M, Cappellini E, Romero-Navarro JA, Wales N, Alquezar-Planas DE, Penfield S, Brown TA, Vielle-Calzada JP, Montiel R, Jorgensen T, Odegaard N, Jacobs M, Arriaza B, Higham TF, Ramsey CB, Willerslev E, Gilbert MT (2013): Deep sequencing of RNA from ancient maize kernels. *PLoS One*: e50961 (9 pp).
- Ginolhac A, Vilstrup J, Stenderup J, Rasmussen M, Stiller M, Shapiro B, Zazula G, Froese D, Steinmann KE, Thompson JF, Al-Rasheid KA, Gilbert TM, Willerslev E, Orlando L (2012): Improving the performance of true single molecule sequencing for ancient DNA. *BMC Genomics* 13: 177 (14 pp).
- Gokhman D, Lavi E, Prufer K, Fraga MF, Riancho JA, Kelso J, Paabo S, Meshorer E, Carmel L (2014): Reconstructing the DNA methylation maps of the Neandertal and the Denisovan. *Science* 344:523-527.
- Green RE, Krause J, Ptak SE, Briggs AW, Ronan MT, Simons JF, Du L, Egholm M, Rothberg JM, Paunovic M, Paabo S (2006): Analysis of one million base pairs of Neanderthal DNA. *Nature* 444: 330-336.
- Guy PL (2013): Ancient RNA? RT-PCR of 50-year-old RNA identifies peach latent mosaic viroid. *Arch Virol* 158: 691-694.
- Guy PL (2014): Prospects for analyzing ancient RNA in preserved materials. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 5: 87-94.
- Guy PL, Gerard PJ (2016): White clover cryptic virus-1 in New Zealand and eastern Australia. *Ann Appl Biol* 168: 225-231.
- Harris TD, Buzby PR, Babcock H, Beer E, Bowers J, Braslavsky I, Causey M, Colonell J, Dimeo J, Efcavitch JW, Giladi E, Gill J, Healy J, Jarosz M, Lapen D, Moulton K, Quake SR, Steinmann K, Thayer E, Tyurina A, Ward R, Weiss H, and Xie Z (2008): Single-molecule DNA sequencing of a viral genome. *Science* 320: 106-109.
- John KK, Botkin DS, Burton AS, Castro-Wallace SL, Chaput JD, Dworkin JP, Lehman N, Lupisella ML, Mason CE, Smith DJ, Stahl S, Switzer C (2016): The Biomolecule Sequencer Project: Nanopore sequencing as a dual-use tool for crew health and astrobiology investigations. 47th Lunar and

- Planetary Science Conference (21-25 March 2016; The Woodlands, TX, USA). Web <<http://ntrs.nasa.gov/search.jsp?R=20160002394>>.
- McNally B, Singer A, Yu Z, Sun Y, Weng Z, Meller A (2010): Optical recognition of converted DNA nucleotides for single-molecule DNA sequencing using nanopore arrays. *Nano Lett* 10: 2237-2244.
- Millar CD, Lambert DM (2013): Ancient DNA: Towards a million-year-old genome. *Nature* 499: 34-35.
- Ng TF, Chen LF, Zhou Y, Shapiro B, Stiller M, Heintzman PD, Varsani A, Kondov NO, Wong W, Deng X, Andrews TD, Moorman BJ, Meulendyk T, MacKay G, Gilbertson RL, Delwart E (2014): Preservation of viral genomes in 700-y-old caribou feces from a subarctic ice patch. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: 16842-16847.
- Noonan JP, Coop G, Kudaravalli S, Smith D, Krause J, Alessi J, Chen F, Platt D, Paabo S, Pritchard JK, Rubin EM (2006): Sequencing and analysis of Neanderthal genomic DNA. *Science* 314: 1113-1118.
- Orlando L, Gilbert MTP, Willerslev E (2015): Applications of next-generation sequencing -Reconstructing ancient genomes and epigenomes. *Nat Rev Genet* 16: 395-408.
- Orlando L, Ginolhac A, Raghavan M, Vilstrup J, Rasmussen M, Magnussen K, Steinmann KE, Kapranov P, Thompson JF, Zazula G, Froese D, Moltke I, Shapiro B, Hofreiter M, Al-Rasheid KA, Gilbert MT, Willerslev E (2011): True single-molecule DNA sequencing of a Pleistocene horse bone. *Genome Res* 21: 1705-1719.
- Ozsolak F, Platt AR, Jones DR, Reifemberger JG, Sass LE, McInerney P, Thompson JF, Bowers J, Jarosz M, and Milos PM (2009): Direct RNA sequencing. *Nature* 461: 814-818.
- Pedersen JS, Valen E, Velazquez AM, Parker BJ, Rasmussenforlando M, Lindgreen S, Lilje B, Tobin DJ, Kelly TK, Vang S, Andersson R, Jones PA, Hoover CA, Tikhonov A, Prokhortchouk E, Rubin EM, Sandelin A, Gilbert MT, Krogh A, Willerslev E, Orlando L (2014): Genome-wide nucleosome map and cytosine methylation levels of an ancient human genome. *Genome Res* 24: 454-466.
- Rezzonico F (2014): Nanopore-based instruments as biosensors for future planetary missions. *Astrobiology* 14: 344-351.
- Rivera-Perez JI, Cano RJ, Narganes-Storde Y, Chanlatte-Baik L, Toranzos GA (2015): Retroviral DNA Sequences as a Means for Determining Ancient Diets. *PLoS One* 10: e0144951 (10 pp).

Schubert M, Ginolhac A, Lindgreen S, Thompson JF, Al-Rasheid KA, Willerslev E, Krogh A, Orlando L (2012): Improving ancient DNA read mapping against modern reference genomes. *BMC Genomics* 13: 178 (15 pp).

Seguin-Orlando A, Gamba C, Sarkissian CD, Ermini L, Louvel G, Boulygina E, Sokolov A, Nedoluzhko A, Lorenzen ED, Lopez P, McDonald HG, Scott E, Tikhonov A, Stafford TWJr, Alfarhan AH, Alquraishi SA, Al-Rasheid KA, Shapiro B, Willerslev E, Prokhortchouk E, Orlando L (2015): Pros and cons of methylation-based enrichment methods for ancient DNA. *Sci Rep* 5: 11826 (15 pp).

Smith O, Clapham A, Rose P, Liu Y, Wang J, Allaby RG (2014): A complete ancient RNA genome: identification, reconstruction and evolutionary history of archaeological Barley Stripe Mosaic Virus. *Sci Rep* 4: 4003 (6 pp).

Smith RW, Monroe C, Bolnick DA (2015): Detection of Cytosine methylation in ancient DNA from five native American populations using bisulfite sequencing. *PLoS One* 10: e0125344 (23 pp).

Wu W, Stupi BP, Litosh VA, Mansouri D, Farley D, Morris S, Metzker S, Metzker ML (2007): Termination of DNA synthesis by N6-alkylated, not 3'-O-alkylated, photocleavable 2'-deoxyadenosine triphosphates. *Nucleic Acids Res.* 35:6339-6349.

