

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Aleksandra M. Žegarac

**Analiza drevne DNK iz uzoraka
nekropole Mokrin (2100 – 1800
p.n.e.): rekonstrukcija biološkog
srodstva u kontekstu društvene
strukture bronzanodopske
populacije**

Doktorska disertacija

Beograd, 2023

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Aleksandra M. Žegarac

**Ancient DNA analyses of individuals
of the Mokrin necropolis (2100 - 1800
BC): the reconstruction of kinship
and social organization of Early
Bronze Age society**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2023

MENTORI:

dr Biljana Stojković,
redovni profesor, Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

dr Sofija Stefanović,
redovni profesor, Univerzitet u Beogradu - Filozofski fakultet

KOMISIJA:

dr Marko Porčić,
vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu - Filozofski fakultet

dr Jelena Jovanović,
naučni saradnik, Univerzitet u Novom Sadu - Institut Biosens

dr Dušanka Savić Pavićević
redovni profesor, Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

dr Sofija Pavković Lučić,
redovni profesor, Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

Datum odbrane: _____

**Analiza drevne DNK iz uzoraka nekropole Mokrin (2100 – 1800 god. p.n.e.):
rekonstrukcija biološkog srodstva u kontekstu društvene strukture
bronzanodopske populacije**

REZIME

Analiza biološkog srodstva u arheologiji pruža uvid u problematiku rođaćkih odnosa u kontekstu organizovanja strukture društva i prenosa statusa i materijalnog bogatstva sa generacije na generaciju. Razvoj paleogenetike, kroz analizu drevne DNK i u određivanje srodstva, doprineo je razumevanju socijalne organizacije i socijalnih promena u ranim egalitarnim i hijerarhijski organizovanim društvima.

Dvadeset četiri petrozne kosti sa rano-bronzanodopske nekropole u Mokrinu analizirane su novom generacijom sekvenciranja kako bi se uvidilo postoji li vertikalna i horizontalna socijalna diferencijacija na ovoj nekropoli i na koji način su se materijalni i socijalni status nasleđivali.

Analizom srodstva detektovano je 9 porodičnih veza koje uključuju 15 individua. Sveukupni podaci sugerišu da su bogatstvo i status vezani za pol individue: dok sinovi nisu nasleđivali socijalni status od bioloških majki, ali su imali priliku da ga zasluže tokom života, žene su mogle naslediti status od majki ili ga postići putem socijalnih veza. Genetički podaci takođe sugerišu da se ne može prihvatiti hipoteza o podeljenosti nekropole na južni i severni deo na osnovu porodičnih veza. Veliki diverzitet uniparentalnih genetičkih markera sugeriše da društvo u Mokrinu nije bilo matrilokalno, ali i da nije bilo strogo patrilokalno, dok procenjeni koeficijent inbridinga ukazuje na odsustvo genetičke strukturiranosti. Osnovne populacione analize na populaciji sa Mokrina ne pokazuju nikakvo odstupanje od očekivanih proporcija porekla karakterističnog za bronzano doba, niti uzorci izlaze iz opsega genetičke varijabilnosti savremenih populacija u Evropi.

Na istim uzorcima procenjena je učestalost alela funkcionalnih markera za depigmentaciju kože i toleranciju na mleko. Izvedeni aleli povezani sa svetlom kožom i plavim očima prisutni su u populaciji sa Mokrina, dok je učestalost alela za toleranciju laktoze kod 18 uzoraka sa Mokrina niska.

KLJUČNE REČI: drevna DNK, paleogenetika, NGS, bronzano doba, Mokrin, srodstvo, inbriding, uniparentalni markeri, populacione analize, tolerancija na laktozu.

NAUČNA OBLAST: Biologija

UŽA NAUČNA OBLAST: Paleogenetika

Ancient DNA analyses of individuals of the Mokrin necropolis (2100 - 1800 BC): the reconstruction of kinship and social organization of Early Bronze Age society

ABSTRACT

Detecting biological relatedness is significant in archeology as it is believed that kinship ties were important in organization of societies and that they were the main mechanism of transgenerational transmission of status and wealth. With development of paleogenetics field, ancient DNA became efficient tool in determining kinship in order to better understand social organization and social changes in early egalitarian and hierarchical societies.

Twenty-four petrous bones from Early Bronze Age Mokrin necropolis were sequenced with NGS method to address the hypotheses regarding vertical and horizontal stratification of the necropolis and to obtain information whether the wealth and status were hereditary.

Nine kin relationships were identified among 15 individuals. The observed results indicate that the wealth and status were depended on the individuals' sex: men could not inherit status from their biological mothers, but they probably could achieve it during life, while women could inherit the status or accomplish it through their links with prestigious individuals. aDNA analyses could not confirm hypothesis regarding the division of necropolis into Northern and Southern parts in which each community was integrated through kinship ties. The great variability of uniparental genetic markers indicates that Mokrin society was not matrilinear, but it was also not a strictly patrilocal, while estimated inbreeding coefficient indicates that the population was genetically unstructured. The basic population analyses do not show any unexpected results of ancestry proportions, and all Mokrin samples could be placed within genetic variation of modern Europeans.

Frequency of alleles for skin depigmentation markers and lactose tolerance were also estimated in Mokrin population. Derived alleles associated with light hair and blue eyes are detected, while the frequency of allele for lactose tolerance in 18 Mokrin samples is low.

KEY WORDS: ancient DNA, paleogenetics, NGS, bronze age, Mokrin, kinship, inbreeding, uniparental markers, population analyses, lactose tolerance

SCIENTIFIC FIELD: Biology

SCIENTIFIC SUBFIELD: Paleogenetics

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Koncept srodstva	1
1.1.1. Biološko srodstvo	1
1.1.1.1. Inbriding	4
1.1.2. Socijalno srodstvo.....	7
1.1.3. Značaj studija srodstva	8
1.1.4. Metode istraživanja srodstva	9
1.1.4.1. Antropološki markeri.....	10
1.1.4.2. Genetički markeri	12
1.2. Drevna DNK.....	14
1.2.1. Razvoj paleogenetike	14
1.2.2. Očuvanost drevne DNK.....	17
1.2.3. Degradacija drevne DNK	19
1.2.3.1. Fragmentacija molekula	19
1.2.3.2. Stvaranje lezija koje blokiraju amplifikaciju DNK	20
1.2.3.3. Stvaranje lezija koje dovode do pogrešnog sparivanja baza	21
1.2.4. Kontaminacija savremenom DNK.....	22
1.2.4.1. Adekvatno rukovanje arheološkim materijalom.....	25
1.2.5. Materijal za izolovanje DNK.....	25
1.3. Nova Generacija Sekvenciranja (NGS)	28
1.4. Socijalna organizacija praistorijskih društava.....	31
1.4.1. Društveni status i evolucija socijalne nejednakosti	31
1.4.2. Bronzano doba	34
1.4.3. Genetička struktura Evrope za vreme bronzanog doba	35
1.4.4. Arheološko nalazište Mokrin.....	38
1.4.4.1. Sahranjivanje u Mokrinu	40
1.4.4.2. Moriška naselja	43
1.4.4.3. Materijalna kultura	44
1.4.4.4. Socijalna organizacija.....	45
1.5. Funkcionalni markeri.....	48
1.5.1. Pigmentacija	49
1.5.2. Tolerancija na laktozu	52
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	55
3. MATERIJAL I METODE.....	57
3.1. SKELETNI MATERIJAL.....	57
3.1.1. Uzorkovanje materijala.....	57
3.1.2. Fizičko antropološke analize na skeletima sa Mokrina	59

3.2. METODE	61
3.2.1. Produkcija paleogenoma.....	61
3.2.1.1. Priprema uzoraka za DNK izolovanje	61
3.2.1.2. Izolovanje DNK.....	62
3.2.1.3. Priprema biblioteke za skrining uzoraka	63
3.2.1.4. Kvantifikacija DNK i spajanje uzoraka	66
3.2.1.5. Skrining uzoraka	66
3.2.1.6. Sekvenciranje celih genoma	67
3.2.2. Bioinformatičke analize	69
3.2.2.1. Obrada podataka	69
3.2.2.2. Provera autentičnosti rezultata.....	73
3.2.2.3. Određivanje pola.....	74
3.2.2.4. Uniparentalni Markeri	75
3.2.3. Analize srodstva	75
3.2.3.1. Analiza srodstva pomoću <i>lcMLkin</i> programa.....	76
3.2.3.2. Analiza srodstva pomoću programa <i>READ</i> (engl. <i>Relationship Estimation from Ancient DNA</i>)	76
3.2.4. Populacione analize uzoraka sa Mokrina	77
3.2.4.1. Analiza glavnih komponenti.....	77
3.2.4.2. Analize porekla populacije u Mokrinu	78
3.2.4.3. <i>f</i> -statistika.....	79
3.2.4.4. Koeficijent inbridinga – <i>f</i>	80
3.2.5. Funkcionalni markeri.....	81
4. REZULTATI	83
4.1. Skrining uzoraka	83
4.2. Duboko sekvenciranje	83
4.3. Provera autentičnosti rezultata	85
4.4. Određivanje pola	88
4.5. Uniparentalni markeri	90
4.6. Analize srodstva	91
4.7. Populacione analize	93
4.7.1. <i>PCA</i> analiza	93
4.7.2. Analize porekla.....	94
4.7.3. <i>Outgroup f₃</i> statistika	96
4.7.4. Koeficijent inbridinga – <i>f</i>	98
4.8. Fenotipski markeri	99
5. DISKUSIJA	101
5.1. Biološko srodstvo među individuama u Mokrinu i nasleđivanje statusa	101

5.2. Bračno prebivalište.....	107
5.3. Rekonstrukcija socijalne organizacije u Mokrinu	112
5.4. Genetička varijabilnost i struktura populacije sa Mokrina	113
5.5. Inbriding.....	116
5.6. Fenotipski markeri	118
5.6.1. Pigmentacija	118
5.6.2. Tolerancija na laktozu	119
6. ZAKLJUČAK.....	122
LITERATURA.....	125
PRILOG 1	149
PRILOG 2	160

Skraćenice

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

A - adenin

G - guanin

C – citozin

T - timin

U - uracil

bp – bazni par

MO - mikroorganizmi

T - temperatura

PCR – lančana reakcija polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction*)

NGS - nova generacija sekvenciranja

STR – kratki tandemski ponovci (engl. *Short Tandem Repeats*)

SNP – pojedinačni nukleotidni polimorfizmi (engl. *Single Nucleotide Polymorphisms*)

mtDNK – mitohondrijska DNK

NR1 - nerekombinovani delovi Y hromozoma (engl. *non-recombining region Y*)

BC – pre nove ere

LP - tolerancija na laktozu (engl. *lactase persistence*)

rCRS – engl. *revised Cambridge Reference sequence*

PCA – analiza glavnih komponenti (engl. *Principal Component Analysis*)

1. UVOD

1.1. Koncept srodstva

Posmatranje sličnosti bioloških srodnika od velikog je značaja za razvoj genetike i dobijanje informacija o genetičkim promenama, principima nasleđivanja, kao i o naslednom udelu određenih karakteristika i bolesti (Jacquard 1974). Srodstvo se takođe može koristiti i za objašnjenje altruističkog ponašanja i na koji način selekcija favorizuje individue koje pomažu genetičke srodnike povećavajući njihovu adaptivnu vrednost po cenu sopstvenog preživljavanja i reprodukcije (Hamilton 1964). Ovi podaci od značaja su i u populacionoj genetici jer se srodnici moraju isključiti iz statističkih analiza.

Pored genetike, informacija o srodstvu može biti korisna i u brojnim drugim disciplinama. U forenzici se koristi za identifikaciju individua, u poljoprivredi prilikom ukrštanja vrsta i predviđanja aditivnih i dominantnih komponenti, a u konzervacionoj biologiji radi sprečavanja reprodukcije između srodnika (Weir et al. 2006). S obzirom da porodica i brak imaju ključnu ulogu u organizovanju života pojedinaca kako u sadašnjosti tako i u prošlosti, procenjivanje srodstva veoma je važno i u arheologiji i antropologiji. U arheologiji, ovi podaci mogu se koristiti za procenjivanje socijalne organizacije društva u prošlosti, kao i za dobijanje informacija na koji način je došlo do razvoja i održavanja socijalne nejednakosti među članovima jednog društva.

1.1.1. Biološko srodstvo

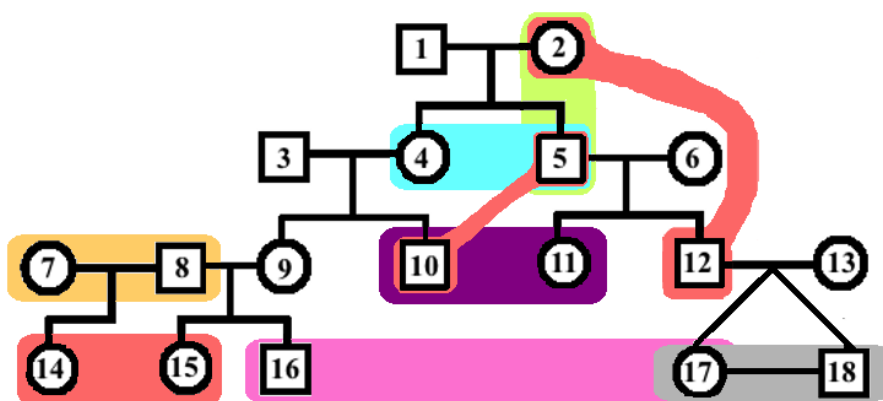
Biološko srodstvo se definiše kao proporcija gena koju delimo sa srođnicima. Kako bi podaci o srodstvu bili informativni, ono se mora kvantifikovati, a to se najčešće radi preko koeficijenta srodstva \emptyset (engl. *coefficient of kinship* ili *coancestry coefficient*), koji kvantifikuje prisustvo identičnih gena i broj generacija koje razdvajaju dve individue (Jacquard 1974; Weir et al. 2006). Drugim rečima, koeficijent srodstva predstavlja verovatnoću da su dva nasumično izabrana alela na istom lokusu dve individue identična po poreklu (engl. *identical by descent - IBD*), tj. nasleđeni od bližeg zajedničkog pretka (Jacquard 1974; Lipatov et al. 2015). Broj segmenata koji su identični po poreklu daje informaciju o genetičkoj vezi među individuama. Što je broj ovih segmenata veći i duži, to su individue bliže i dele skorijeg zajedničkog pretka. Kako srođnička veza postaje

dalja, povećava se broj mejoza koji ove segmente razdvaja, njihov broj značajno opada i razbija se na manje delove u procesu rekombinacije (Racimo et al. 2020).

Odnos koeficijenta srodstva \emptyset sa k koeficijentima – Kotermanovi koeficijenti (engl. *Cotterman coefficients*) i koeficijentom r (engl. *coefficient of relatedness*) može se opisati jednačinom:

$$2\emptyset = r = \frac{k_1}{2} + k_2$$

$k_0 + k_1 + k_2 = 1$, gde k_0 , k_1 i k_2 definišu broj alela koje dve diploidne jedinice dele usled zajedničkog porekla (Racimo et al. 2020). Dok k_0 predstavlja verovatnoću da dve individue nemaju alele koji su identični po poreklu na nasumičnom lokusu u genomu, k_1 i k_2 predstavljaju verovatnoću da dve individue imaju jedan, odnosno oba alela koji su identični po poreklu. Vrednosti ovih koeficijenata zavise od stepena srodstva (Slika 1.1., Tabela 1.1.).



Slika 1.1. Šematski prikaz porodičnog stabla. Zelenom bojom je prikazana roditeljska veza, plavom bojom veza između brata i sestre, narandžasta boja prikazuje nesrodne individue, dok su crvenom bojom prikazane veze drugog stepena (veza između bake i unuka, ujaka i sestrića ili polubraće i sestara). Dalje rođacke veze prikazane su ljubičastom (prvi rođaci) i roze bojom (drugi rođaci). (Slika modifikovana iz Racimo i saradnici (2020) i Vai i saradnici (2020)).

Tabela 1.1. \emptyset i k koeficijenti za srodničke veze. \emptyset - koeficijent srodstva; k – Kotermanovi koeficijenti.

Srodnička veza	Individue	\emptyset	k_0	k_1	k_2
Identični blizanci	17 - 18	0.5	0	0	1
Roditelj - dete	2 - 5	0.25	0	1	0
Brat - sestra	4 - 5	0.25	0.25	0.5	0.25
Baka - unuk, ujak – sestrić, polubraća (sestre)	2 - 12, 5 - 10, 14 - 15	0.125	0.5	0.5	0
Prvi rođaci	10 - 11	0.0625	0.75	0.25	0
Drugi rođaci	16 - 17	0.0156	0.9375	0.0625	0
Supružnici	7 - 8	0	1	0	0

Hardi-Vajnbergova teorema podrazumeva da se učestalosti alela u idealnoj populaciji ne menjaju, a da učestalosti genotipova predstavljaju proizvode učestalosti alela (Tucić 2003)¹. Da bi populacija bila idealna, u populaciji se mora odigravati panmiksija, odnosno nasumično ukrštanje (engl. *random mating*). Međutim, situacija je često drugačija u realnosti, a asortativno ukrštanje (ukrštanje koje nije nasumično i ukazuje na biranje partnera koji su fenotipski ili genetički sličniji/različitiji od prosečnog para u populaciji) narušava Hardi Vajnbergovu ravnotežu i dovodi do promena u učestalosti genotipova u populaciji. Asortativno ukrštanje može biti pozitivno, kada se ukrštaju individue sa sličnim genotipovima i fenotipovima, ili negativno, kada dolazi do ukrštanja individua različitih genotipova i fenotipova (Hamilton 2013). Procene srodstva i način ukrštanja među individuama je od važnosti za procene učestalosti genotipova u populaciji.

Efekat nenasumičnog ukrštanja na učestalosti genotipova se kvantifikuje indeksom fiksacije (F) koji predstavlja odnos između Hardi-Vajnbergovih očekivanih učestalosti heterozigota (H) sa njihovim stvarnim učestalostima u populaciji², pri čemu heterozigotnost predstavlja meru genetičke varijacije u populaciji, i može se meriti i kada postoje više od dva alela na lokusu (Hamilton 2013).

$$F = \frac{(H_{očekivana} - H_{dobijena})}{H_{očekivana}}$$

Vrednost indeksa fiksacije F se definiše od -1 (broj heterozigota H je veći od očekivanog) do 1 (broj homozigotnih genotipova je veći od očekivanog). Indeks fiksacije može poslužiti i za procenu obrasca ukrštanja, jer više vrednosti ukazuju da je do ukrštanja došlo među sličnim individuama (ukrštanje među srođnicima ili samooplođivanje).

¹ U idealnoj populaciji ne dolazi do delovanja evolucionih mehanizama i takva populacija ima sledeće karakteristike: vrsta je diploidna, polno se razmnožava, generacije se ne preklapaju, dolazi do slučajnog ukrštanja, populacija je neograničeno velika, migracije i mutacije su zanemarljive, a prirodna selekcija ne utiče na učestalost alela. Teorijski značaj ovakvih populacija je njihovo poređenje sa realnim populacijama kako bi se utvrdile promene učestalosti alela i genotipova pod delovanjem određenih evolucionih mehanizama (Tucić 2003).

² Razlika između očekivanih i dobijenih učestalosti heterozigota deli se sa očekivanom heterozigotnošću, kako bi se dobla proporcija i kako bi se F definisao od -1 do 1.

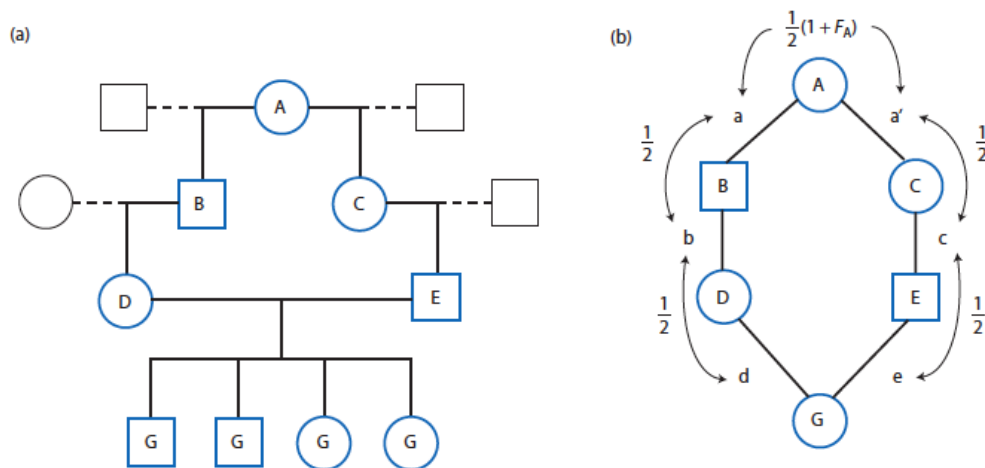
1.1.1.1. Inbriding

Rođaci, nasuprot dvema nasumično odabranim individuama, imaju veću verovatnoću da dele jedan ili dva alela koji su nasleđeni od zajedničkog pretka. Iz ovog razloga, ukrštanje među srođnicima ili inbriding (engl. *inbreeding*) povećava verovatnoću da će potomstvo dobiti isti alel od oba roditelja i imati homozigotni genotip nego u slučajevima kada dolazi do nasumičnog ukrštanja. Drugim rečima, inbriding povećava verovatnoću da su dva nasumična alela na lokusu dve individue identična po poreklu (Racimo et al. 2020). Na taj način se smanjuje genetička varijabilnost u populaciji i povećava njena strukturiranost (Hamilton 2013). Do inbridinga može doći i usled male efektivne veličine populacije.

Koeficijent inbridinga (f) može imati vrednosti od 0 do 1 i definiše se sledećom jednačinom:

$f = \left(\frac{1}{2}\right)^n (1 + F_A)$, gde je n broj individua uključenih u rodoslovno stablo, a F_A je verovatnoća da je individua A autozigot, tj. homozigot sa alelima identičnim po poreklu (Slika 1.2.). Ukoliko individua A nije autozigot, tj. ako je F_A jednak nuli, koeficijent inbridinga iznosi:

$$f = \left(\frac{1}{2}\right)^n$$



Slika 1.2. (a) Rodoslovno stablo se koristi za izračunavanje verovatnoće da su dva alela na jednom lokusu osobe G identična po poreklu. Slika (b) prikazuje uprošćenu verziju rodoslovnog stabla i put u kome se aleli mogu naslediti od osobe A. (Slika preuzeta iz Hamilton (2013)).

Iako inbriding dovodi do opadanja heterozigotnosti, koje je proporcionalno povećanju koeficijenta inbridinga, inbriding ne utiče na promenu učestalosti alela za razliku od genetičkog drifta³ koji može dovesti i do gubitka alela iz populacije (Hamilton 2013).

$$\text{Učestalost alela } p \text{ nakon inbridinga: } D = p^2 + fpq$$

$$\text{Učestalost heterozigota: } H = 2pq - f2pq = 2pq(1 - f)$$

$$\text{Učestalost alela } q \text{ nakon inbridinga: } R = q^2 + fpq$$

Kada se očekivana heterozigotnost ($H_{\text{očekivana}}$) zameni za $2pq$, dobijena heterozigotnost u populaciji usled efekta inbridinga iznosi:

$$H_{\text{dobijena}} = H_{\text{očekivana}}(1 - f)$$

$$f = 1 - \frac{H_{\text{posmatrana}}}{H_{\text{očekivana}}} = \frac{(H_{\text{očekivana}} - H_{\text{posmatrana}})}{H_{\text{očekivana}}}, \text{ jer } i \text{ indeks fiksacije } i \text{ koeficijent}$$

inbridinga predstavljaju procenu heterozigotnosti u populaciji.

Kao posledica promena učestalosti genotipova i efekta na adaptivnu vrednost, koji je povezan sa ovim promenama, može doći i do promena fenotipova u populaciji. Usled opadanja heterozigotnosti i povećanja homozigotnosti, inbriding može dovesti do povećanja učestalosti recesivnih štetnih mutacija i povećanja učestalosti recesivnih homozigota, te visok inbriding za posledice ima slabiji imunitet, pojavu bolesti, smanjeni fertilitet, rast, preživljavanje potomstva ili opadanje njihove reproduktivne sposobnosti kod jedinki koje su za štetne recesivne alele homozigotne (Charlesworth and Willis 2009; Ceballos et al. 2018). Ovo povećanje homozigotnosti za recesivne štetne mutacije, koje su inače niske učestalosti u populaciji, označava se kao inbriding depresija. U ovim slučajevima dolazi do povećanja genetičkog opterećenja, pri čemu se štetni homozigoti odstranjuju iz populacije i dolazi ili do ponovnog uspostavljanja ravnoteže ili do izumiranja populacije. Inbriding depresija može dovesti i do smanjene učestalosti adaptivno korisnih heterozigota, pri čemu se učestalost heterozigota neće oporaviti dok god se obrazac ukrštanja ne promeni (Charlesworth and Willis 2009).

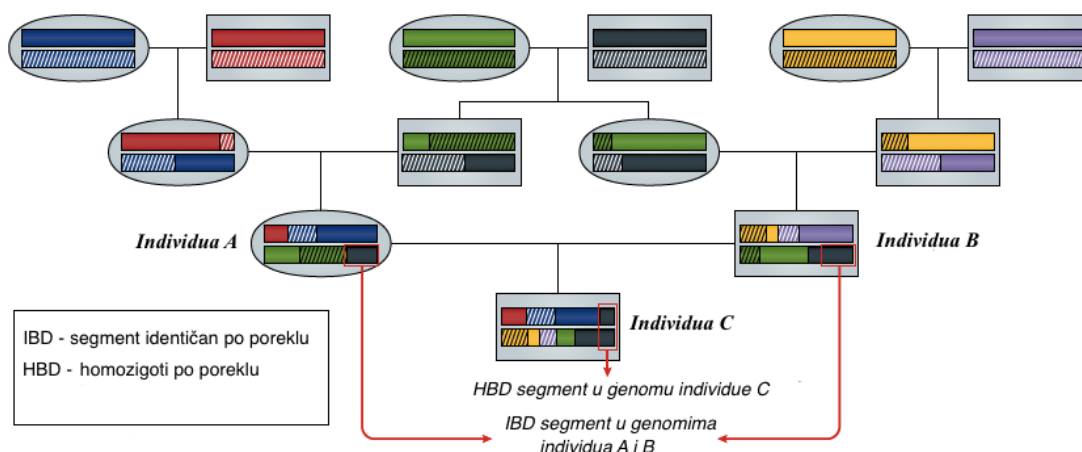
Autozigotnost ili homozigotnost po poreklu (engl. *homozygosity by descent* - *HBD*) predstavlja verovatnoću da će neka jedinka imati u svom genotipu par alela ($2n$) identičnog porekla. Nasuprot tome, alozigotnost predstavlja situaciju kada dva alela nisu

³ Genetički drift se definiše kao slučajno odstupanje u učestalostima alela u populaciji (Tucić 2003).

nasleđena od istog pretka. U populaciji ograničene veličine, bilo koja dva genska alela mogu biti identičnog porekla, te verovatnoća autozigotnosti nije jednaka nuli. Kako dva biološka srodnika dele veliki deo genoma (tj. dugačke segmente identične po poreklu), inbriding rezultuje u homozigotnosti na brojnim segmentima genoma kod potomaka (Racimo et al. 2020). Identifikacija ovakvih segmenata može biti veoma informativna prilikom procenjivanja demografske istorije jedne populacije, procene da li je bilo epizoda inbridinga u populaciji, kao i predviđanju povećanog rizika za retke recesivne bolesti (Slika 1.3.) (Ceballos et al. 2018). Na primer, genomska struktura populacije koja je prošla kroz usko grlo, pokazivaće kod potomaka veliki broj kratkih segmenta homozigotnih po poreklu od malog broja osnivača. Međutim, potomci srodnih individua pokazuju duže i kontinuirane segmente homozigotne po poreklu, a broj ovih segmenata pruža procenu koeficijenta inbridinga (Racimo et al. 2020). Male populacije odlikuje više ovakvih segmenata u poređenju sa velikim populacijama i populacijama sa izraženim protokom gena. Najviše segmenata identičnih po poreklu pronalazi se u populacijama sa malom efektivnom veličinom u kojima je zastupljen inbriding (Ceballos et al. 2018).

Homozigotni segmenti identični po poreklu nejednako su distribuirani u genomu, češći u regionima genoma gde je visok nivo neravnoteže vezanosti i mali stepen rekombinacije (u X hromozomu i delovima genoma niskog genetičkog diverziteta) s obzirom na to da rekombinacije dovode do narušavanja vezanih kombinacija sekvenci na hromozomima tokom mejoze, te dugački predački haplotipovi opstaju duže u ovakvim regionima (Slika 1.3.) (Ceballos et al. 2018).

Dugački i kontinuirani homozigotni genotipovi mogu se detektovati specifičnim metodama procene homozigotnosti (engl. *runs of homozygosity* - *ROH*). S obzirom da se ove metode oslanjaju na dobijanje tačnih diploidnih genotipova, dostupni su samo za drevne uzorke sa visokom pokrivenošću sekvenciranja. Druge metode koje se oslanjaju na dobijanje najverovatnijih genotipova zahtevaju poznavanje učestalosti alela koji nisu dostupni za drevne populacije (Racimo et al. 2020).



Slika 1.3. Šematski prikaz rekombinacije i inbridinga. (Slika preuzeta i modificovana iz Racimo i saradnici (2020)).

1.1.2. Socijalno srodstvo

Koncept biološkog srodstva definiše se kroz statične i nepromenljive genetičke veze i stoga se veoma često odnosi samo na tradicionalni, odnosno nuklearni model porodice. S obzirom da se individue ponašaju različito prema srođnicima među kojima je primećena veća verovatnoća požrtvovanja, srodstvo se prepliće sa mnogim socijalnim pitanjima i ima veliki uticaj na međuljudske odnose i strukturu društva. Čovek je jedina vrsta kod koje postoji veza između srodstva i institucija, jer upravo ono predstavlja centar socijalne organizacije, kako u prošlim, tako i u savremenim društvima (Crews and Bogin 2010). Organizacija porodice utiče na ponašanje čoveka i njegove svakodnevne odluke, poput ekonomskih aktivnosti, kolektivnih akcija, formiranje grupa i afinalnih veza (brakova), a posledično je odgovorna i za distribuciju materijalnog bogatstva, razvoj institucionalizovane socijalne nejednakosti, veza unutar i između zajednica i organizaciju društva (Smith et al. 2010; Mattison et al. 2016). Drugim rečima, socijalno-politička hijerarhija u velikoj meri formira se na osnovu porodičnih veza, oko kojih se organizuje i održava ekonomija i ideologija zajednica (Crews and Bogin 2010).

Koncept srodstva je vremenski i prostorno varijabilan, i ne postoji univerzalan obrazac porodice i bračnog prebivanja koje je najčešće patrilokalno (formira se oko očeva) ili matrilokalno (formira se oko majke) (Cronk et al. 2019). Upravo zbog nerazumevanja značaja različitih koncepata porodice, posmatranje srodstva i njegove uloge u društvu ne predstavlja lak zadatak. Značajan porast studija srodstva poslednjih godina javio se kao odgovor na sveprisutniji stav u medijima da je tipična i tradicionalna

porodica najbolja po individue, decu i društvo (Sear and Mace 2008; Johnson and Paul 2016). Međutim, kao što je već pomenuto, normativi porodice nisu svuda isti i zavise od mnogih faktora. Stoga, vrednost istraživanja u sagledavanju različitih modela porodice u društvenom kontekstu, uz premisu da je socijalno srodstvo veoma važan činilac u organizovanju zajednice, zavisi od mnogih faktora i pokazuje da ne postoji jedan univerzalan model porodice.

Nasuprot biološkom srodstvu, socijalno srodstvo je dinamičan i složeni kulturni proces u kome su nesrodne individue integrisane u društvo socijalnim vezama (Alt and Vach 1995). Ono se definiše kao bilo koji proces organizovan oko zajedničkog prostora, hrane, rada ili iskustva, i koji na taj način povećava socijalnu interakciju, kao i prava i odgovornosti među članovima zajednice (Johnson and Paul 2016). Kooperacija među užim i širim srodnicima, imala je i veliki uticaj na verovatnoću preživljavanja deteta u prošlosti. Ovakav kulturni napredak, poput zajedničke brige o potomstvu, predstavlja važnu odskočnicu u ljudskoj evoluciji jer utiče na povećanje populacije i fertiliteta žena u praistoriji (Sear and Mace 2008; Sear 2018).

Iako bi u lokalnoj idealnoj populaciji trebalo da dolazi do slučajnog ukrštanja, socijalni faktori i te kako utiču na odabir partnera i stvaran broj ljudi koji ostavljaju potomstvo. Međutim, za proučavanje socijalnog ponašanja ljudi, odnosno strategije reprodukcije i izbora partnera, potrebne su informacije o životnoj sredini, populacionoj strukturi i socijalnim vezama između individua (Tucić 2003). Saradnja i rivalstvo između pojedinaca i grupa, kao i formiranje brakova, često zavise od porekla individue. Poznato je da su se ljudi često venčavali unutar grupa, formirajući određenu srodničku strukturu, a u genetičkom smislu povećavali stepen inbridinga, što može dovesti do brojnih genetički uzrokovanih poremećaja⁴.

1.1.3. Značaj studija srodstva

Utvrđivanje porodične organizacije u drevnim populacijama od velikog je značaja u analizama zajednica, jer predstavlja vezu sa socio-političkom organizacijom drevnih društava (Ensor et al. 2017) i doprinosi razumevanju socijalne strukture i socijalnih

⁴ Smatra se da je do povećanog ukrštanja u srodstvu dolazilo kada je saradnja među članovima grupe neophodna i u slučaju velikih konflikata, te je brak u prošlosti bio važan za održavanje socijalnih interakcija i često je označavao ujedinjenje između klanova zbog sukoba oko zemlje i hrane (Bittles and Black 2010).

promena u ranim egalitarnim i hijerarhijski organizovanim društvima (Alt and Vach 1995). Analize srodstva omogućavaju rekonstrukciju bračnog prebivališta, obrazaca nasleđivanja imovine i društvenog statusa, sahranjivanja, podele rada i formiranja nejednakosti u odnosu na pol ili socijalnu poziciju individue (Alt and Vach 1995; 1998; Stojanowski and Schillaci 2006; Larsen and Walker 2010; Meyer et al. 2012; Johnson and Paul 2016). Informacije o ovim suštinski kratkoročnim procesima mogu biti povezane sa pitanjima poput mobilnosti ljudi, zamena populacija, difuzije ekonomskih i kulturnih karakteristika, kao i prirodnom veza unutar društva i između društava (Johnson and Paul 2016). Socijalne veze predstavljaju esencijalni deo integracije u društvo, a razumevanje na koji način su pojedinci ili grupe integrisane u sistem neophodan je za proučavanje kvaliteta i načina života, demografske strukture i političke i ekonomske evolucije praistorijskih društava.

Istraživanje srodstva i socijalne organizacije u prošlosti od velikog je značaja za bolje upoznavanje i sagledavanje promenljive prirode porodice - šta je to što označava "normalnu" porodicu tokom ljudske istorije, ko ima prava na sklapanje braka i podizanje dece ili nasleđivanje materijalnog bogatstva (Johnson and Paul 2016). Ove studije mogu doprineti razumevanju ljudskog ponašanja i društava po pitanjima afiniteta ka stvaranju porodice i uslova koji dovode do ostvarivanja različitih porodičnih struktura.

1.1.4. Metode istraživanja srodstva

Sve biološke karakteristike čoveka pod uticajem su kulture i fizičke okoline, tj. zavise od dostupnosti prirodnih resursa, ishrane, klimatskih uslova, prisutnosti patogena, ali i društvenog konteksta u kom se odvija život. Stoga se biologija živih bića i socijalni fenomeni ne mogu posmatrati odvojeno jedno od drugog. Posmatranje samo jednog dela dokaza nesumnjivo vodi ka pogrešnim interpretacijama, pa se biološki i kulturni činioci moraju sagledati kao jedna celina radi potpunijeg razumevanja socijalne strukture drevnih populacija (Meyer et al. 2012).

Informacije o organizaciji porodica u prošlosti se dobijaju posmatranjem skeletnih ostataka i konteksta u kom su pronađeni (Larsen and Walker 2010). Studije različitih kultura, koje se zasnivaju na ovim pristupima, polaze od premise da društvena organizacija može biti koristan pokazatelj promenljive prirode porodične strukture i mogu doprineti definisanju zajedničkih porodičnih karakteristika unutar populacija, kao

i činiocima koji doprinose variranju u zavisnosti od sredinskih uslova, tj. predstavljaju adaptacije na određenu sredinu (Sear and Mace 2008).

1.1.4.1. Antropološki markeri

Holistički pristup i integracija naučnih metoda u rekonstrukciji načina života praistorijskih zajednica doprineli su razvoju bioarheologije kroz multidisciplinarna istraživanja koja spajaju arheologiju sa biologijom, i obuhvataju i biološki i socijalni aspekt srodstva. Drugim rečima, svaka informacija dobijena iz osteoloških ostataka, uključujući i patologiju i traumu, mora biti integrisana u arheološki i socijalni kontekst radi dobijanja verodostojne slike o socijalnoj strukturi društva (Meyer et al. 2012; Johnson and Paul 2016).

Intraregionalne analize, koje se bave poređenjem fenotipskih i morfoloških karakteristika na nivou individua, najčešće se koriste za identifikaciju srodnih grupa u nekropolama (Buikstra et al. 1990; Stojanowski and Schillaci 2006; Ricaut et al. 2010; Meyer et al. 2012; Ensor et al. 2017). Analiza biološke distance, koja predstavlja meru sličnosti i razlika između populacija ili grupa unutar populacija (Buikstra et al. 1990), koristi dve klase fenotipskih osobina za dobijanje genetičke informacije: 1. kvantitativne, tj. metričke karakteristike i 2. kvalitativne, tj. nemetričke ili diskretne karakteristike. Metričke osobine predstavljaju kontinuirane karakteristike koje mogu imati bilo koju vrednost u populaciji (od konkretne minimalne do maksimalne vrednosti), poput dužine i širine zuba ili kranijuma (Larsen 2002; Pietrusewsky 2008)⁵. Nemetričke (diskretne ili diskontinuirane) osobine⁶ odnose se na karakteristike koje se ne mogu izraziti u mernim

⁵ Tradicionalno, varijable uzimane u metričkim analizama bile su linerane dimenzije (proste distance i uglovi), definisane specifičnim tačkama na uzorku. Razvoj geometrijske morfometrije i 3D analize omogućile su vizualizaciju malih promena oblika što predstavlja jednu od značajnih prednosti u odnosu na tradicionalnu morfometriju. Geometrijska morfometrija se bazira na obeležavanju i merenju distanci među specifičnim tačkama i upotrebi digitalne tehnologije i tro-dimenzionalnih tehnika za vizuelizaciju (Ivanović and Kalezić 2013). Primenom ove metode moguće je kvantifikovati varijabilnost u obliku morfoloških struktura koje se potom nezavisno analiziraju uni- i multivarijantnim statističkim metodama kako bi se procenila sličnost između populacija ili individua, kao i za klasifikaciju nepoznatih vrsta (Pietrusewsky 2008; Ivanović and Kalezić 2013).

⁶ Da bi se dokazalo da individue koje poseduju mali broj retkih ili anomalnih fenotipskih karakteristika jesu članovi porodice, potrebno je proveriti da li je povećana učestalost ovih osobina statistički značajna, tj. nasledna (Fišerov t-test), a ne rezultat slučajnosti. To se postiže definisanjem nulte i alternativne hipoteze. Nulta hipoteza podrazumeva da su individue nasumično izabrane iz populacije, dok alternativna hipoteza podrazumeva njihovu srodnost (Stojanowski and Shillaci 2006). Male p vrednosti i odbacivanje nulte hipoteze sugerišu da je pojava specifičnih osobina u posmatranim grupama rezultat njihove genetičke povezanosti, a ne slučajnosti (Alt and Vach 1995).

jedinicama, već su ove morfološke varijante ili odsutne ili prisutne u različitom stepenu fenotipske ekspresije (npr. osobina je prisutna u tragovima, parcijalno prisutna ili kompletno prisutna).

Analize biološke distance baziraju se na pretpostavci da populacije koje razmenjuju partnere tokom vremena postaju fenotipski sličnije i dele određene skeletne i dentalne karakteristike. Tačnije, takve populacije imaju značajno sličnije srednje vrednosti za metričke osobine (poput veličine i oblika), kao i slične učestalosti za nemetričke osobine (zajednička morfološka anomalija ili varijanta), dok je konačan efekat nizak nivo osteometrijskih razlika između susednih ili sukcesivnih populacija i opadanje fenotipske varijabilnosti (Stojanowski and Shillaci 2006). Nasuprot tome, populacije koje međusobno ne razmenjuju partnere postaju fenotipske različite brzinom koja je srazmerna njihovoj efektivnoj veličini (Stojanowski and Shillaci 2006; Larsen and Walker 2010).

Alt i saradnici (1997) opisali su i identifikovali nekoliko preduslova koje je potrebno zadovoljiti kako bi se utvrdilo srodstvo među pronađenim individuama na arheološkom nalazištu. Osnovna ideja u ovim studijama je da za svaku porodicu postoji set retkih karakteristika koje su nasledne i jedinstvene. Stoga, fenotipske karakteristike koje se posmatraju moraju biti nasledne, retke u populaciji, nezavisne od godina i pola i naravno dostupne za posmatranje. Dodatna značajna informacija o srodniciima dobija se posmatranjem prostorne i vremenske organizacije arheološkog nalazišta ukoliko su retke osobine prisutne sa nešto većom učestalošću među individuama koje su sahranjene jedna kraj druge (Alt and Vach 1995; Stojanowski and Shillaci 2006).

Anatomske dentalne varijante korisniji su parametri od linearnih dimenzija kranijuma, pre svega zbog njihove bolje očuvanosti i dostupnosti čak i kada je ostatak tela dezintegrisan (Meyer et al. 2012). Takođe, dentalne osobine su pod većom genetičkom kontrolom nego skeletne mere, lako se posmatraju i slabo su zavisne od pola i starosti (Alt et al. 1997; Larsen 2002; Stojanowski and Shillaci 2006; Scott 2008). Alt and Vach (1995) su objavili spisak od 137 osobina koje su korisne u utvrđivanju srodstva: varijante krunica i korena zuba, različiti oblici, broj (npr. hipodoncija), veličina, struktura i pozicija zuba, određene nemetričke osobine kranijuma i vilice i abnormalije koje uključuju vilice i zube. Međutim, većina osobina je pod poligenomskom kontrolom, tj. između određenih osobina postoji genetička povezanost i te osobine moraju se zajedno

posmatrati (Scott 2008). Postkranijalne mere ne mogu biti zastupljene u analizi za procenu bioloških veza jer nisu dovoljno genetički varijabilne i podložne su promenama pod uticajem sredinskih faktora (Buikstra et al. 1990).

1.1.4.2. Genetički markeri

Posmatranje fizičko-antropoloških markera, iako jeste efikasna, jeftina i nedestruktivna metoda, ipak ima prilična ograničenja u određivanju srodstva i pola. Naime, ove metode ograničene su očuvanošću uzoraka i nepouzdanošću fizičkih markera (pogotovo kod dece), a detekcija srodstva moguća je samo ukoliko je dovoljan broj karakteristika i osoba uključeno u analizu, pri čemu ne postoji mogućnost da se detektuju specifične biološke veze, poput roditeljstva ili braće i sestara. Takođe, greške obuhvataju i greške merenja, zavisne od samih istraživača. Druga velika mana fenotipskih analiza je njihova plastičnost, tj. veliki sredinski uticaj na razviće fenotipa. Stoga, sličnost u osteometrijskim parametrima između individua ne mora biti rezultat zajedničkih gena već uticaja zajedničke sredine na razviće svojstava (Stojanowski and Schillaci 2006).

Molekularne studije su se u poslednjih 20 godina pokazale veoma efikasnim u prevazilaženju ograničenja standardnih antropoloških metoda u određivanju pola (Stone et al. 1996; Skoglund et al. 2013) i veza među članovima porodice (npr. Gill et al. 1994; Keyser-Traqui et al. 2003; Haak et al. 2008; Deguilloux et al. 2014; O'Sullivan et al. 2018). Na taj način, analiza drevne DNK, uz savremene bioinformatičke metode, može dati uvid u porodični život praistorijskih populacija, njihove socijalne mreže, običaje sahranjivanja, itd. Ovakav pristup omogućava odgovore na brojna pitanja - između ostalog i na pitanje nasleđivanja materijalnog i socijalnog statusa. Takođe, genetička informacija se može koristiti kako bi se utvrdila genetička varijabilnost i kretanje populacija zavisno od pola (Knipper et al. 2017), kao i za testiranje hipoteza patri- i matrilokalnosti.

Minisatelitski markeri, koji su se koristili u prvim studijama srodstva, brzo su zamenjeni mikrosatelitima i nukleotidnim polimorfizmima (Weir et al. 2006; Canturk et al. 2014). Mikrosateliti predstavljaju kratke tandemske ponovke (engl. *short tandem repeats* - *STR*) dužine od 2-5 baznih parova koji se najčešće koriste u forenzici i testovima očinstva, s obzirom da su visoko polimorfni u populacijama. Ove sekvence imaju visoke stope mutacije i heterozigotnosti. Dodatno, u populacionim analizama koriste se tzv.

neutralni markeri čija se učestalost ne menja pod uticajem prirodne selekcije, već se promene dešavaju isključivo usled mutacija, genetičkog drifta i migracija, tj. protoka gena (Kimura 1968). Takvim mikrosatelitskim genetičkim markerima ljudski genomi obiluju.

Danas se u paleogenetičkim analizama najčešće koriste pojedinačni nukleotidni markeri (engl. *single nucleotide polymorphism* - *SNP*) s obzirom da su fragmenti drevne DNK najčešće kraći od 100 bp, pa je lakša identifikacija tačkastih mutacija (zamena pojedinačnih nukleotida) u odnosu na mikrosatelitske lokuse koji zahtevaju duže fragmente genoma. Pojedinačni nukleotidni markeri mutiraju ređe (značajno niža stopa mutacija) u odnosu na mikrosatelite, manje su varijabilni i pokazuju stabilnije transgeneracijsko nasleđivanje (Amorim and Pereira 2005). Prilikom analiza ovih markera treba imati u vidu da se pouzdanost rezultata povećava istovremenom analizom većeg broja međusobno nezavisnih markera (Weir et al. 2006). U genomu postoje milioni pojedinačnih nukleotidnih polimorfizma koji se mogu simultano analizirati, a neki od njih pružiti i fenotipske informacije. Ovakvi markeri jesu pod uticajem prirodne selekcije i utiču na adaptivnu vrednost organizama u određenim uslovima sredine.

Genetički markeri na mitohondrijskoj DNK (mtDNK) i nerekombinovanom delu Y hromozoma (engl. *non-recombining region Y* - *NR1Y*, deo Y hromozoma koji ne podleže rekombinaciji sa X hromozomom) mogu biti korisni za odbacivanje srodstva između muških individua, ali ne i za utvrđivanje stepena srodstva. Nedostatak ovih markera je mogućnost rekonstruisanja genealogije samo po jednoj roditeljskoj liniji (nasleđuju se uniparentalno), kao i nemogućnost detektovanja veza, poput majke i ćerke, zbog identičnosti mtDNK u čitavoj ženskoj liniji. Dodatno, ovi markeri ne podležu procesu rekombinacije, koji predstavlja veliki izvor genetičke varijabilnosti, te se nove varijante stvaraju samo mutacijama (supstitucije, insercije i delecije). Varijabilnost genetičkih markera koji se nasleđuju uniparentalno takođe je značajno osetljivija na promene u efektivnoj veličini populacija, tj. promene učestalosti ovih markera pod velikim su uticajem genetičkog drifta. Pored studija srodstva, markeri na mtDNK koriste se za rekonstrukciju demografskih procesa koji su oblikovali varijabilnost drevnih i savremenih populacija (npr. Haak et al. 2010; Brandt et al. 2013; Bollongino et al. 2013; Allentoft et al. 2015; Haak et al. 2015; Fu et al. 2016).

Za razliku od mtDNK i Y hromozoma, markeri na autozomima nasleđuju se od oba roditelja – po jedan alel od svakog roditelja se prenosi na potomstvo pri čemu nastaju kombinacije ovih alela. Analiza kompletnih genoma omogućava preciznu detekciju porodičnih veza i dobijanje informacije o procesima mešanja populacija, kao i odgovore na brojna demografska pitanja - npr. da li postoje razlike u migracijama muškog i ženskog pola.

I pored toga što je ispitivanje drevne DNK značajno efikasnija i specifičnija metoda za utvrđivanje porodičnih veza, klasično arheološke metode su često jedine dostupne zbog visoke cene, zahtevnih uslova i opreme, kao i zbog nedovoljne očuvanosti molekula DNK. U takvim slučajevima, korisno je koristiti fenotipske karakteristike i specifičnu organizaciju nekropole kao procenu srodnosti i socijalne organizacije populacije (Haak et al. 2008; Ricaut et al. 2010). Dodatni problem paleogenetičkih istraživanja često su i malobrojnost individualnih skeletnih ostataka i njihova nejednaka i ograničena geografska distribucija. Iz ovih razloga, često je nemoguće nasumično odabrati uzorke za analizu, te se statistički modeli moraju specijalno prilagođavati. Takođe, pažljiva interpretacija paleogenetičkih podataka je neophodna i mora biti posmatrana u kontekstu i u skladu sa hemijskim, arheološkim i antropološkim podacima, u međusobnoj saradnji genetičara, arheologa, antropologa i lingvista.

1.2. Drevna DNK

1.2.1. Razvoj paleogenetike

Razvojem metoda poput lančane reakcije polimeraze (engl. *polymerase chain reaction* - PCR) (Mullis and Faloona 1987) i najpre Sangerove metode sekvenciranja (Sanger et al. 1977), a potom i nove generacije sekvenciranja – NGS (engl. *new Generation Sequencing*) (Margulies et al. 2005; Bentley et al. 2008) omogućena je amplifikacija i određivanje sekvence veoma male količine DNK prisutne u arheološkom materijalu.

Osnovni cilj paleogenetike je kvantifikacija genetičkog diverziteta u različitim vremenskim periodima i klimatskim uslovima i proučavanje procesa koji su doveli do formiranja genetičkog diverziteta kakvog detektujemo danas. Molekularna evolucija podrazumeva promene na genima i promene u učestalosti alela u populaciji. Ona je

rezultat dinamičnih i složenih procesa poput prirodne selekcije, različitih demografskih procesa (promene u veličini populacije, mešanja i zamena populacija, migracije, prolaska kroz uska grla), i stohastičkih procesa poput genetičkog drifta i mutacija (Stoneking and Krause 2011; Li and Durbin 2011; Lazardis et al. 2014; 2016). Da bi se razumela složena istorija pređašnjih populacija i procesa koji su doveli da stvaranja genetičke varijabilnosti savremenih populacija, svi ovi procesi se moraju uzeti u obzir.

Studije drevne DNK omogućile su rekonstrukciju istorije ljudskih populacija i pružile odgovore na dugo postavljena pitanja o poreklu populacija (Ingman et al. 2000; Slatkin and Racimo 2016), filogenetskim odnosima između izumrlih i savremenih vrsta, kao i o vremenu divergencije među njima⁷ (Green et al. 2010; Reich et al. 2010). Analize drevne DNK omogućile su i otkrivanje novih vrsta, poput denisovaca, i to samo iz molara i malog dela prsta u Sibiru (Reich et al. 2010)⁸.

Sa porastom broja i preciznosti studija ljudskih populacija došlo se i do informacija o velikim migracijama, demografskim promenama i protoku gena između populacija, kao i na koji način su ovi procesi doprineli promenama u genetičkoj varijabilnosti. Studije su vodile ka saznanju o trojnom poreklu današnjih Evropljana: od zapadnih lovaca sakupljača (engl. *Western hunter-gatherers - WHG*), populacija koje vode poreklo sa Bliskog istoka i dolaze u Evropu za vreme neolita (engl. *Early European*

⁷ Sa analizama drevne DNK rasvetljene su filogenetske veze moe, mamuta i mastodona, velikih lenjivaca, pećinskog lava, medveda iz Pleistocena i mnogih drugih (Pääbo et al. 2004). Takođe se danas mnogo više zna o susretu neandertalskog (*Homo sapiens neanderthalensis*) i savremenog čoveka (*Homo sapiens sapiens*) (Green et al. 2010; Fu et al. 2016). Savremeni ljudi napustili su Afriku pre oko 50,000 - 80,000 godina i na svom putu sreli su neandertalce na Bliskom istoku (pre oko 37,000 - 86,000) (Prüfer et al. 2014, Sankararaman et al. 2014; Fu et al. 2014; 2015), a potom i denisova populaciju u Novoj Gvineji (Green et al. 2010). Na osnovu prvih analiza mtDNK pretpostavilo se da do mešanja između neandertalaca i anatomski modernog čoveka nije došlo (Krings et al. 1997), s obzirom da se njihova mtDNK razlikovala od mtDNK savremenih populacija. Međutim, ova mogućnost se nije mogla odbaciti jer je doprinos neandertalskih gena mogao biti izgubljen u procesima genetičkog drifta ili kontinuiranim prilivom DNK anatomski savremenog čoveka u neandertalski genski fond (Pääbo et al. 2004). Kasnija istraživanja jedarne DNK pokazala su da je do mešanja ipak došlo (Green et al. 2010) i da su genomi ljudi iz neafričkih populacija bili 4% sličniji neandertalskom genomu nego genomi ljudi iz dve afričke populacije. Danas se zna da prosečno 2% genoma savremenog čoveka u Evroaziji potiče od neandertalaca, dok drevni genom savremenog čoveka sadrži viši procenat neandertalske DNK (Fu et al. 2016). S obzirom da stupanje u kontakt sa populacijama koje sadrže nižu stopu neandertalske DNK ne može objasniti primetno smanjenje kod savremenih ljudi, smatra se da je prirodna selekcija delovala protiv neandertalske DNK u ljudskom genomu (Fu et al. 2016).

⁸ Denisovci predstavljaju sestrinsku grupu neandertalaca, koja se od njih odvojila nakon što su se preci savremenog čoveka rastali od neandertalaca. Komponenta genoma denisovaca može se naći kod ljudi koji naseljavaju Maleziju, kod starosedeoaca na australijskom kontinentu, i u manjoj meri kod istočnih Azijata (Slatkin and Racimo 2016).

farmers - EEF), i Jamne populacije poreklom iz stepa (Allentoft et al. 2015; Mathieson et al. 2015; Haak et al. 2015; Fu et al. 2016; Lazaridis et al. 2016; Lipson et al. 2017).

Promene učestalosti alela nekih gena mogu biti i rezultat adaptacije na različite uslove sredine (Pääbo et al. 2004). U određenim slučajevima, kada su fenotipske promene proizvod pojedinačnih mutacija, moguće je ustanoviti delovanje prirodne selekcije analizama drevne DNK. Takve studije rađene su, na primer, u slučaju pigmentacije (Wilde et al. 2014) i gena za toleranciju na laktozu (Itan et al. 2009; Saag et al. 2019; Burger et al. 2020).

Analize drevne DNK omogućile su i determinisanje kompletnih genoma mikroorganizama, što je značajno za studije paleopatologije, s obzirom na to da su patogeni prisutni u velikoj količini u mekanom tkivu, a relativno mali broj njih ostaviće tragove i lezije na kostima i zubima. Otkriće ovih patogena doprinelo je saznanjima o njihovom poreklu i koevoluciji sa domaćinima (npr. Schuenemann et al. 2011; 2013; Rasmussen et al. 2015). Takođe, poslednjih godina sve više se analiziraju i upoređuju mikrobiomi pređašnjih i savremenih populacija do čijih je promena došlo usled kulturnih inovacija, najpre sa razvojem poljoprivrede i domestikacije životinja pre oko 10,000 godina, a potom i sa industrijskom revolucijom (Tito et al. 2012; Adler et al. 2013; Warinner et al. 2015).

Kulturne inovacije i ekološke promene uticale su na život ljudi, dovodile do migracija i interakcija među populacijama, i doprinele njihovom razvoju i promenama u socijalnoj organizaciji. Genetički markeri pokazali su se korisnim u studijama socijalne organizacije (Keyser-Traqui et al. 2003; Haak et al. 2008; Mittnik et al. 2019), za određivanje pola individue kod dece i nedovoljno očuvanih skeletnih ostataka (Stone et al. 1996; Skoglund et al. 2013), utvrđivanje dinamike maternalnih i paternalnih linija (Mittnik et al. 2019; Furtwängler et al. 2020, Sjögren et al. 2020), kao i istorije migracija muškaraca i žena (Knipper et al. 2017).

Pre razvoja nove generacije sekvenciranja, analize drevne DNK uglavnom su bile zasnovane na analizi hipervarijabilnih regiona mtDNK (Krings et al. 1997). Postojanje mitohondrija u stotinama kopija u ćeliji omogućava lakše izolovanje DNK iz arheološkog materijala. Mitohondrijska DNK ima veliku stopu mutacije i nasleđuje se samo po

majčinoj liniji, pri čemu ne dolazi do rekombinacije⁹. Razvoj NGS omogućio je analizu ne samo kompletne mtDNK (npr. Krause et al. 2010; Meyer et al. 2014), već i kompletne jedarne DNK, a time i analize genetičkih markera na jedarnom genomu i nerekombinovanim delovima Y hromozoma, najpre iz 20,000 godina starog mamuta pronađenog u Sibiru (Miller et al. 2008), a potom i čoveka: paleo-Eskimo individue sa Grenlanda¹⁰ (Rasmussen et al. 2010), neandertalaca (Green et al. 2010; Prüfer et al. 2014), denisovaca u Rusiji (Reich et al. 2010; Meyer et al. 2012), najstarijeg ljudskog genoma do sada izolovanog (starog oko 430,000 godina) Sima de los Huesos u Španiji (Meyer et al. 2016), slavnog *Ötzi*-ja¹¹ (Keller et al. 2012; Sikora et al. 2014), itd. Veliki potencijal ovih studija naročito će doći do izražaja kada izolovanje drevne RNK (Smith et al. 2014; 2019), kao i epigenetičke studije (Gokhman et al. 2016), postanu sastavni deo istraživanja paleogenetičkih laboratorija.

1.2.2. Očuvanost drevne DNK

Iako su metode molekularne biologije značajno napredovale, određena ograničenja u analizama drevne DNK i dalje postoje. Pored visoke cene i destruktivne prirode analiza, glavni ograničavajući faktori predstavljaju očuvanost drevne DNK i njena mala količina u uzorku.

Degradacija makromolekula DNK počinje odmah nakon smrti organizama kada mehanizmi popravke DNK i kontrolni mehanizmi enzima nukleaza više ne postoje, što dovodi do trajnog narušavanja integriteta genoma (Lindahl 1993). Inicijalni faktor degradacije je aktivnost endogenih nukleaza, koje su u živim ćelijama pod strogom

⁹ MtDNK je dvolančani, kružni molekul, koji se sastoji od lakog i teškog lanca, što je rezultat nejednake raspodele G i C baza u lancima. Sadrži 16,569 bp i gene neophodne za procese oksidativne fosforilacije i dobijanje ćelijske energije (Anderson et al. 1981). Na mtDNK razlikuju se kodirajući region i 1,100 bp dug kontrolni region, u okviru kojeg se nalaze i hipervarijabilni regioni (*HVS-I*, *HVS-II* i *HVS III*) koji su se najčešće koristili za analize varijabilnosti populacija. Mutaciona stopa mtDNK (pogotovo u kontrolnom regionu) prevazilazi stopu mutacije jedarnog genoma, što može biti posledica nedostatka popravkih mehanizama ili prisustva slobodnih radikala formiranih tokom procesa ćelijskog disanja (Witas and Zawicki 2004). Takođe, metoda molekuskog sata, kada se uzmu u obzir različite stope mutacija i reverzne mutacije, može se koristiti za procene starosti ženskih linija i vremena njihove divergencije (Witas and Zawicki 2004).

¹⁰ Paleo-Eskimo populacija predstavlja prvu populaciju ljudi koja je započela ekspanziju iz Sibira na Arktik pre oko 4,500 godina, i čija se migracija razlikuje od prethodnih koje su dovele do stvaranja američkih starosedeoaca, pre oko 13,000 godina (Rasmussen et al. 2010; Slatkin and Racimo 2016).

¹¹ *Ötzi* je 5,300 godina stara mumija pronađena u Alpima, čiji genom pokazuje sličnosti sa današnjim populacijama Sardinije (Keller et al. 2012; Sikora et al. 2014).

kontrolom. Takođe, kosti gube svoju gustinu i postaju porozne, što za posledicu ima lakše i dublje prodiranje vode u tkivo i degradaciju biomolekula (Dabney et al. 2013).

Količina mikroorganizama (MO), bakterija ili gljiva, koji dalje razlažu molekule, kao i njihova enzimaska aktivnost, zavise od spoljašnje sredine, te se proces degradacije usporava niskim temperaturama (T) ili brzim isušivanjem tela. Međutim, hemijski procesi poput oksidacije i hidrolize, utiču na strukturu i stabilnost DNK molekula bez obzira na uslove i podstiču dalju degradaciju i modifikaciju molekula u odsustvu mehanizama popravke DNK (Lindahl 1993; Pääbo et al. 2004). Rezultat ovih procesa je fragmentovan molekul DNK sa određenim strukturalnim promenama. Iz ovog razloga, u arheološkim uzorcima uvek je pored male količine endogene DNK (DNK od interesa) prisutna i velika količina egzogene DNK (sredinska DNK) (Briggs et al. 2007; Marciniak et al. 2015).

Iako je zapaženo da se fragmentacija DNK povećava sa starošću uzorka (Allentoft et al. 2012), ova korelacija nije uočena kada su poređeni uzorci sa različitih arheoloških nalazišta (Sawyer et al. 2012). Iz ovoga sledi da mnogi procesi utiču na očuvanost makromolekula, tj. da analiza u najvećoj meri zavisi od sredine u kojoj je uzorak pronađen, a tek onda od starosti (Marciniak et al. 2015; Llamas et al. 2017). Količina endogene DNK može značajno varirati čak i u okviru jednog arheološkog nalazišta, jer količina vode, salinitet, pH, kao i brzina rasta MO, variraju na "mikroskali" (Dabney et al. 2013).

Sredina u kojoj je DNK najbolje očuvana je ona u kojoj nema velikih promena temperature i vlažnosti, jer vlažnost u kombinaciji sa visokom T dovodi do brže diageneze kostiju i degradacije biomolekula (Bollongino et al. 2008). Voda predstavlja glavni faktor degradacije, jer dovodi do razlaganja apatita u kostima i omogućava rast i razmnožavanje MO. Povećane temperature ubrzavaju hemijske reakcije i razmnožavanje MO, a sunčeva svetlost takođe uvećava količinu slobodnih radikala koje vode ka oksidaciji DNK (Bollongino et al. 2008). Degradacija molekula DNK zavisi i od tipa zemljišta u kojem se uzorak nalazi, te optimalna kiselost zemljišta za očuvanje molekula iznosi pH 7.8 (Pruvost et al. 2007; Bollongino et al. 2008).

Permafrost predstavlja sredinu gde su biomolekuli odlično očuvani i uspešno izolovani iz biljaka (Willerslev et al. 2007), mikroorganizama (Bellemain et al. 2013,

Legendre et al. 2014), životinja¹² (Orlando et al. 2013) i ljudi (Rasmussen et al. 2010). Pećine, zbog konstantne hladne i suve klime tokom cele godine, takođe predstavljaju odličan izvor dobro očuvanih arheoloških uzoraka. S obzirom da su pećine tamna, anaerobna i blago bazna zemljišta, aktivnost MO je smanjena, a razlaganje kostiju usporen proces (Bollongino et al. 2008). Nasuprot pećinama, DNK je lošije očuvana na otvorenim arheološkim nalazištima, kao i na mestima sa toplijom klimom gde su temperature visoke i vlažnost vazduha velika (Bollongino et al. 2008). Ovo u značajnoj meri može uticati na kvalitet istraživanja i mogućnost odgovara na antropološka pitanja¹³.

Zbog malih razlika u mikroklimi, koje mogu dovesti do značajnih razlika u pogledu očuvanosti makromolekula, jedini pouzdani metod da se proverí očuvanost DNK jeste skrining sekvenciranje uzoraka. Međutim, neki pokazatelji za dobru očuvanost DNK mogu biti svetlija boja kostiju i kosti koje nisu porozne i ne sadrže pukotine (Bollongino et al. 2008).

1.2.3. Degradacija drevne DNK

Najčešće promene koje se događaju na drevnoj DNK su: 1. fragmentacija molekula, 2. stvaranje lezija koje blokiraju amplifikaciju, 3. stvaranje lezija koje dovode do pogrešnog sparivanja baza.

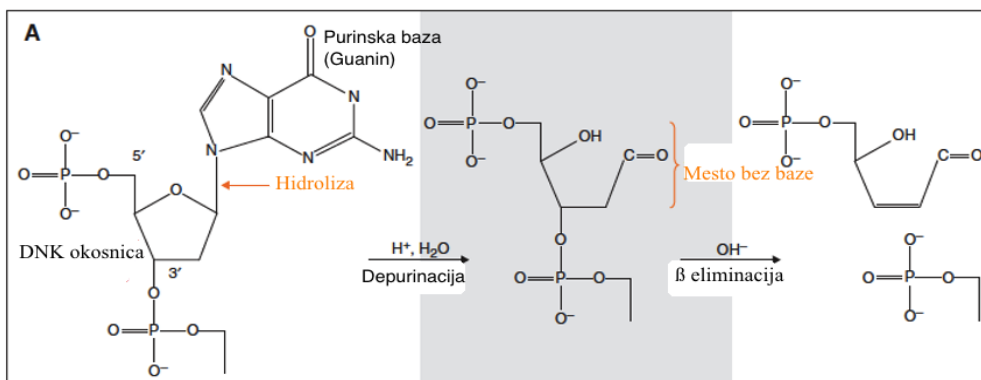
1.2.3.1. Fragmentacija molekula

Glavna karakteristika drevne DNK je redukcija u veličini ovog molekula, na fragmente kraće i od 70 bp, a u slučaju optimalnih uslova (kada su procesi degradacije usporeni) na fragmente veličine oko 100-500 bp (Pääbo et al. 2004; Knapp and Hofreiter 2010; Dabney et al. 2013). Do fragmentacije dolazi odmah nakon smrti organizama, kao što je već navedeno, usled aktivnosti MO i enzima nukleaza koji katalizuju hidrolizu fosfoestarskih veza u DNK okosnici na specifičnim “vrućim” mestima (engl. *hot spots*) između nukleozoma (Lindahl 1993).

¹² Do skoro, najstarija izolovana DNK je bila DNK izolovana iz 700,000 godina starog konja pronađenog u permafrostu (Orlando et al. 2013). Nedavno je objavljeno da su istraživači uspeali da izoluju DNK iz zuba milion godina starog mamuta, takođe pronađenog u permafrostu (<https://www.nature.com/articles/d41586-021-00442-z>).

¹³ Na primer, uzorak denisova individue, pronađenog u pećini u južnom Sibiru, sadržao je čak 70% endogene DNK (Reich et al. 2010), dok je samo 0.01% - 0.03% endogene DNK izdvojeno iz ranog modernog čoveka u pećini u severnoj Kini (Fu et al. 2013).

NGS tehnologija omogućila je sekvenciranje krajeva kratkih fragmenta DNK i dobijanje informacije o tome da li je redukcija u veličini DNK posledica hidrolitičke depurinacije (gubitka adenina - A i guanina - G) (Briggs et al. 2007; Meyer et al. 2012). Usled depurinacije, DNK lanac podleže reakciji β eliminacije, što rezultuje u hidrolizi fosfoestarskih veza u okosnici i prekidu lanca DNK (Lindahl 1993; Pääbo et al. 2004; Dabney et al. 2013). Rezultat β eliminacije su krajnji 5'-fosfatni i 3'-aldehidni krajevi (Slika 1.4.). Analize konja iz pleistocena starog 40,000 godina (Orlando et al. 2011) takođe su pokazale da je G na 5' krajevima prisutniji od A, tj. da je depurinacija G češća, što je najverovatnije posledica rezonantne strukture guanina koja zahteva nižu aktivacionu energiju za pucanje N-glikozidne veze (Overballe-Petersen et al. 2012; Dabney et al. 2013). Međutim, A je dominantan na 5' krajevima u relativno mladim uzorcima (oko 100 godina) (Sawyer et al. 2012) usled degradacije enzimima (Dabney et al. 2013). Bitno je još pomenuti da nije zapažena korelacija DNK fragmentacije sa godinama uzorka (Sawyer et al. 2012).



Slika 1.4. Fragmentacija molekula DNK izazvana hidrolitičkom depurinacijom. Prvo dolazi do hidrolize N-glikozidne veze između purina i šećera, što rezultuje u oslobađanju baze. Potom je DNK lanac fragmentovan u procesu β eliminacije, ostavljajući 5'-fosfatne i 3'-aldehidne krajeve. (Slika preuzeta i modifikovana iz Dabney i saradnici (2013)).

1.2.3.2. Stvaranje lezija koje blokiraju amplifikaciju DNK

Prilikom izlaganja uzoraka jonizujućem zračenju dolazi do oksidacije i formiranja slobodnih radikala (O_2^- , OH^- , i H_2O_2) koji napadaju dvostruke kovalentne veze u bazama i okosnici DNK, što za posledicu ima fragmentaciju baznih prstenova i šećernog prstena (Hofreiter et al. 2001; Pääbo et al. 2004). Rezultat oksidacije, pre svega pirimidina (citozina - C i timina - T), jesu modifikovane baze koje se nazivaju hidantoini, molekuli

koje *Taq* polimeraza ne prepoznaje tokom umnožavanja PCR metodom (Hofreiter et al. 2001; Dabney et al. 2013). UV radijacija dovodi i do stvaranja veza između timina čime se takođe blokira amplifikacija (Pääbo et al. 2004).

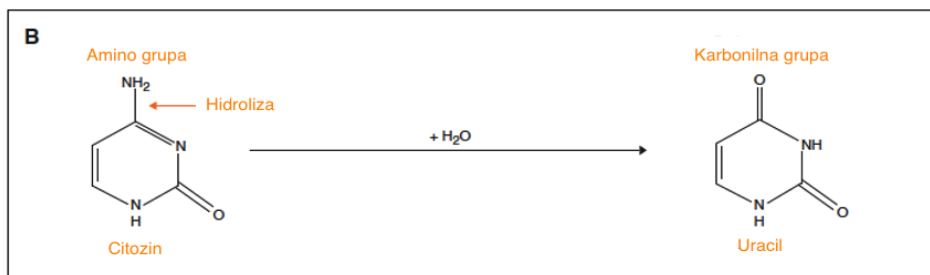
Drugi tip oštećenja koji blokira DNK polimerazu jeste formiranje kovalentnih veza između različitih DNK fragmenata, a ponekad i između dezoksiriboze i primarnih amino grupa u proteinima, kao što je to slučaj u koprolitima (Pääbo et al. 2004).

1.2.3.3. Stvaranje lezija koje dovode do pogrešnog sparivanja baza

N-glikozidna veza između baze i šećera u molekulu DNK podložna je hidrolizi što dovodi do destabilizacije DNK i fragmentacije lanca (Lindahl 1993). Hidroliza u prisustvu kiseline dovodi do gubitka baze i primarne strukture DNK. Pokazano je da se depurinacija (A i G) dešava češće i brže nego depirimidinacija (C i T) (Mitchell et al. 2005; Briggs et al. 2007).

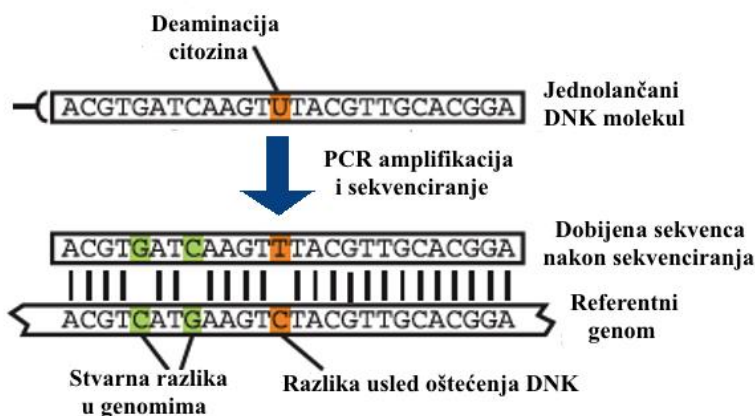
Međutim, baze adenin, citozin, 5-metilcitozin i guanin, takođe su podložne hidrolitičkoj deaminaciji (gubitak amino grupe), što dovodi do stvaranja hipoksantina, uracila, timina, i ksantina, redom (Pääbo et al. 2004). Ovakve promene ne ometaju amplifikaciju DNK, ali će prilikom umnožavanja lanaca doći do pogrešnog sparivanja baza. Dvolančana DNK inače pruža dobru zaštitu od ovakve deaminacije (Lindahl 1993).

Pored fragmentacije, najčešća promena u molekulu drevne DNK upravo je uzrokovana hidrolizom i predstavlja deaminaciju C u U (Slika 1.5.), što za posledicu ima zamenu C sa T tokom amplifikacije DNK u 5' - 3' pravcu (Pääbo et al. 2004; Stiller et al. 2006). U toku amplifikacije U će se sparivati sa A, koji će dalje, prilikom umnožavanja lanca, dovesti do ugradnje T po principu komplementarnosti lanaca. Nakon sekvenciranja, referentni genom biće bogat C, a drevni genom T bazama (Slika 1.6.). Komplementarni kraj drevne DNK odlikuje se tranzicijama G u A (Briggs et al. 2007; Brotherton et al. 2007). Promene C u T dešavaju se sličnom i visokom učestalošću na oba kraja DNK fragmenata (Orlando et al. 2011; Meyer et al. 2012), gde se čak i do 40% C pojavljuje kao T, dok se ove supstitucije smanjuju ka unutrašnjosti molekula (Briggs et al. 2007; Brotherton et al. 2007). Deaminacija je takođe dva puta brža u jednolančanoj nego dvolančanoj DNK (Lindahl 1993), te se smatra da su mnogobrojne C u T supstitucije posledica prisustva jednolančanih krajeva u drevnoj DNK (Briggs et al. 2007; Orlando et al. 2011).



Slika 1.5. Deaminacija C u U. Ova deaminacija rezultuje u pojavi T umesto C na referentnom genomu i pojavi A umesto G na referentnom genomu usled komplementarnosti lanca. (Slika preuzeta i modifikovana iz Dabney i saradnici (2013)).

Jedan od načina da se ove promene uklone jeste upotreba enzima uracil-N-glikozilaze, koji uklanja U i ostavlja prazno mesto koje se kasnije popravlja endonukleazom VIII (Hofreiter et al. 2001; Briggs et al. 2010). Ova karakteristika drevne DNK je u prvim koracima analiza, kada se proverava očuvanost endogene DNK, veoma korisna jer je zajedno sa proverom dužine fragmenata DNK postala glavni kriterijum za proveru autentičnosti rezultata u analizama (Ginolhac et al. 2011; Jónsson et al. 2013). Nasuprot dužini fragmenata, zapaženo je da je proporcija supstitucija C u T na 5' krajevima lanaca pozitivno korelisana sa starošću uzoraka (Sawyer et al. 2012).



Slika 1.6. Pogrešno sparivanje baza usled hidrolitičke deaminacije citozina. (Slika preuzeta i modifikovana iz Stiller i saradnici (2006)).

1.2.4. Kontaminacija savremenom DNK

Prvi pokušaji izolacije drevne DNK započeti su još 1984. i 1985. godine, kada su i objavljeni rezultati analize dela mtDNK iz izumrlog rodaka zebre *Equus quagga* (Higuchi et al. 1984) i deo DNK iz 2,400 godina stare egipatske mumije (Pääbo 1985). Nakon toga, usledila su uzbuđljiva otkrića poput DNK dinosaurus (Woodward et al.

1994), DNK izdvojene iz hloroplasta miocenske biljke (Golenberg et al. 1990) ili ćilibara (DeSalle et al. 1992). Međutim, pokazalo se da su prvi izolati drevne DNK bili lažno pozitivni i posledica kontaminacije savremenom DNK. Upravo su ova pionirska istraživanja bila od velikog značaja jer su dovela do saznanja da kontaminacija savremenom DNK predstavlja najveći izazov u istraživanjima.

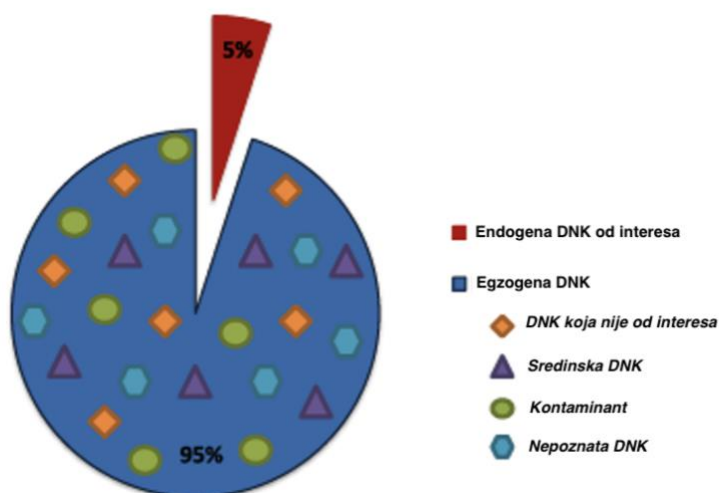
Prilikom izolovanja drevne DNK, ne dolazi samo do izdvajanja endogene DNK, već i DNK poreklom od MO (Briggs et al. 2007; Marciniak et al. 2015; Llamas et al. 2017). U izolatu se takođe može naći i kontaminant, čiji su DNK fragmenti veoma slični endogenoj DNK (Slika 1.7.). Na primer, DNK mikroorganizama ne predstavlja problem u istraživanjima humanog genoma, ali će zbog genetičke srodnosti biti kontaminant u slučaju studija drevnih patogena. U studijama drevnih životinjskih i biljnih vrsta, kontaminacija najčešće potiče od referentnih vrsta koje se koriste u komparativnim studijama (Yang and Watt 2005).

Zbog porozne strukture kostiju kontaminacija će uvek predstavljati problem u paleoantropološkim istraživanjima. Godine rada i iskustva bile su potrebne da bi se razvile metode i mere predostrožnosti kako bi se kontaminacija svela na minimum i smanjila cena analiza (Hofreiter et al. 2001; Pääbo et al. 2004). Za početak, sve analize drevne DNK moraju se obavljati u specijalnim laboratorijama posvećenim samo ovim analizama (Knapp et al. 2012). Ovakve laboratorije sterilizovane su UV svetlom¹⁴, površina i aparati obrisani pomoću izbeljivača i agensom koji uništava DNK (*DNA-Exitus-Plus*), a istraživači su obučeni u zaštitno odelo sa više pari rukavica (Champlot et al. 2010; Knapp et al. 2012). Deo laboratorije za pripremu uzorka i NGS biblioteke (*pre-PCR* sobe) i deo laboratorije za umnožavanje molekula (*post-PCR* sobe)¹⁵ moraju biti odvojene i opremljene *HEPA* ventilacijom sa pozitivnim pritiskom vazduha, kako bi se sprečilo da vazduh spolja ulazi u laboratoriju (Knapp et al. 2012). Međutim, i pored svih

¹⁴ UV svetlo (254 nm) dovodi do formiranja dimera timina koji sprečavaju amplifikaciju jer predstavljaju barijeru za *Taq* polimerazu. Takođe, UV svetlo dovodi do oksidacije baza i prekida jednoničane i dvolančane DNK. Ovaj način dekontaminacije efikasan je samo do određenog stepena jer je efikasnost dekontaminacije ograničena na površine koje su blizu lampi. Takođe, DNK kontaminante na laboratorijskoj opremi je teško odstraniti UV svetlošću (Champlot et al. 2010).

¹⁵ PCR metoda je mogući izvor kontaminacije, jer zbog velike senzitivnosti ove tehnike, postoji opasnost umnožavanja i kontaminanta iako je prisutan u znatno manjoj količini (Yang and Watt 2005; Champlot et al. 2010; Llamas et al. 2017). Čak i kada je kontrola čista, do kontaminacije može doći zbog takozvanog efekta nosača, kada se niska koncentracija kontaminanta vezuje za šećere ili MO koji postaju njihovi nosači i umnožavaju se za vreme PCR reakcije (Pääbo et al. 2004). Na taj način, kontaminant je umnožen zajedno sa izolatom. Ovde je važna negativna kontrola, jer tu ne postoje molekuli-nosači.

predostrožnosti, do kontaminacije može doći zbog nepažnje istraživača ili zbog kontaminacije reagenasa¹⁶ (Champlot et al. 2010). Iz tog razloga, svi rezultati moraju biti reproducibilni, a prilikom svakog eksperimentalnog koraka uključene negativne kontrole u kojima ne postoji uzorak.



Slika 1.7. Izolat drevne DNK. (Slika preuzeta i modificovana iz Marciniak i saradnici (2015)).

U prvim koracima istraživanja specijalna pažnja posvećuje se procesu dekontaminacije koji podrazumeva površinsko uklanjanje potencijalnih izvora kontaminacije (Champlot et al. 2010). Procesi dekontaminacije mogu biti destruktivni po endogenu DNK, te treba pažljivo odabrati metod ili njihovu kombinaciju, a najčešće se koriste UV zračenje, fizičko uklanjanja kontaminacije (poput peskiranja), preinkubacija u fosfatnom puferu (Korlević et al. 2015) ili EDTA (Der Sarkissian et al. 2014; Damgaard et al. 2015), kao i tretiranje malih uzoraka poput zuba ili slušnih košćica izbeljivačem¹⁷ (Malmström et al. 2007; Adler et al. 2013; Korlević et al. 2015).

Međutim, s obzirom da i dalje postoji problem dokazivanja kontaminacije uzoraka sa starijih iskopavanja, kada su istraživanja drevne DNK još uvek bila nepoznanica, potrebno je kombinovati nekoliko programa za dekontaminaciju nakon sekvenciranja DNK jer stariji kontaminant takođe podleže degradaciji i procesima depurinacije (Champlot et al. 2010).

¹⁶ Domaće životinje najčešće su korišćene kao izvor agenasa (na primer, goveđi serum ili želatin), pa mogu biti i izvor kontaminacije (Champlot et al. 2010).

¹⁷ Provera efikasnosti dekontaminacije kvantitativnom PCR metodom pokazala je da je najefikasniji metod ispiranje izbeljivačem. U manjoj meri je efikasno jedonočasovno osvetljivanje UV svetlom na bliskim distancama (10 cm) u slučaju kada određeni materijali ne smeju biti tretirani izbeljivačem (Champlot et al. 2010).

1.2.4.1. Adekvatno rukovanje arheološkim materijalom

S obzirom na cenu molekulskih analiza drevnih uzoraka i problema koji su skopčani s njima, uzorci zahtevaju adekvatno rukovanje, što je detaljno opisano u Žegarac (2019). Sve osobe koje su u kontaktu sa arheološkim materijalom moraju preduzimati sve moguće mere zaštite kako se ne bi desile dodatne degradacije i kontaminacije (Yang and Watt 2005; Pruvost et al. 2007; Bollongino et al. 2008; Allentoft et al. 2012; Llamas et al. 2017).

Uzorke ne treba ispirati (u slučaju potreba muzeja trebalo bi ih očistiti četkom), jer voda, kao i soli i bakterije koje voda sadrži, ubrazavaju degradaciju DNK. Uzorke bi trebalo zakloniti od sunca, pustiti ih da se osuše, i tek onda spakovati odvojeno u plastične i čiste kese, kako bi se sprečilo da vlaga stvori idealne uslove za rast MO. Obavezno treba nositi rukavice prilikom kontakta sa uzorcima i menjati ih između rukovanja različitim uzorcima i nakon dodirivanja drugih objekata. Alatke koje se koriste moraju biti očišćene izbeljivačem i dobro osušene kako izbeljivač ne bi dodatno uništio uzorak (Žegarac 2019).

Poželjno je skladištiti uzorke na suvim mestima gde nema variranja u temperaturi i vlažnosti budući da ovi faktori mogu podstaći hidrolizu i dalji rast MO. Optimalno mesto za čuvanje uzoraka je frižider, a ukoliko se DNK analiza odlaže potrebno je čuvanje na temperaturi od -20 do +4°C (Pruvost et al. 2007; Bollongino et al. 2008). Često menjanje mesta i promene u temperaturi i vlažnosti treba izbegavati.

1.2.5. Materijal za izolovanje DNK

Izbor materijala za izolovanje drevne DNK zavisi od cilja istraživanja, dostupnosti, starosti i očuvanosti materijala, kao i njegove otpornosti na kontaminaciju.

Kalcifikovan materijal je najčešći izbor za izolaciju drevne DNK, pre svega zbog njegove dostupnosti. Zube odlikuje manja poroznost u odnosu na kosti, pa su i manje izloženi kontaminantima. Prilikom odabira zuba za analize, najpoželjniji je koren molara glatke površine (Damgaard et al. 2015; Hansen et al. 2017; Llamas et al. 2017). Zubi su takođe veoma korisni prilikom analize patogena koji mogu ostati zarobljeni u dentalnoj pulpi (Bos et al. 2011; Schuenemann et al. 2011; Wagner et al. 2014), ili u studijama mikrobioma u kojima kamenac služi kao izvor oralnih bakterija (Adler et al. 2013; Warinner et al. 2014).

Kosti za potrebe analize drevne DNK moraju biti očuvanih površina i bez znakova patologije (poput linija i crnih rupa usled napada MO) (Parker et al. 2020). Čvrste, teške i kompaktne kortikalne kosti, poput tibije i femura, pogodnije su za analizu DNK od sunderastih kostiju, kao što su rebra, skapularne kosti, pelvis, i neki delovi lobanje, jer porozan materijal dozvoljava ulazak vode i kontaminaciju (Bollongino et al. 2008; Llamas et al. 2017).

Pravu revoluciju u istraživanju DNK izazvalo je otkriće da izolavanje iz petroznog dela temporalne kosti sisara omogućava dobijanje najveće količine endogene DNK, čak 4-16 puta veće od materijala dobijenog iz zuba (Gamba et al. 2014; Pinhasi et al. 2015), a 183 puta više u odnosu na ostale kosti (Gamba et al. 2014). Petrozna kost predstavlja najgušću kost sisara, čije je remodelovanje tokom individualnog razvića manje u odnosu na ostale kosti, pa su bakterijski uticaj kao i hemijske promene nakon smrti najmanje¹⁸ (Hansen et al. 2017; Furtwängler et al. 2018). Uzorkovanjem najgušćih delova petrozne kosti dobija se manje mitohondrijske DNK u odnosu na jedarnu DNK (Furtwängler et al. 2018).

Ovo otkriće omogućilo je dobijanje informacije iz arheološkog materijala pronađenog i u veoma toplim krajevima, poput Bliskog Istoka (Broushaki et al. 2016; Gallego-Llorente et al. 2016), Okeanije (Skoglund et al. 2016) i Afrike (Gallego-Llorente et al. 2015; van de Loosdrecht et al. 2018). Takođe, upotreba petroznih kostiju značajno je smanjila cenu sekvenciranja jer dobijanje veće količine endogene DNK vodi ka većoj složenosti biblioteka i većoj pokrivenosti genoma (Parker et al. 2020). Ipak, treba imati u vidu da petrozne kosti pružaju i važne paleoantropološke podatke, kao što su kraniometrijske mere značajne za morfološke analize, zbog čega treba sačuvati što više materijala (Sirak et al. 2017).

Slušne koščice (čekić, nakovanj i uzengija) najmanje su koščice u ljudskom telu i imaju slične histološke karakteristike i proces razvića kao unutrašnje uvo (Sirak et al. 2020). Njihova uloga je da omoguće sluh ljudima prenoseći mehaničke vibracije iz

¹⁸ Za odličnu očuvanost DNK u petroznoj kosti zaslužna je velika gustina labirinta, koji dostiže punu veličinu kod čoveka u toku gestacijskog perioda i pokazuje smanjeno remodelovanje tokom individualnog razvića u poređenju sa drugim kostima. Inhibicija remodelovanja kostiju vodi ka prisustvu velikog broja mineralizovanih osteocita (sa smanjenim brojem mitohondrija) koji ostaju u lakunama u tkivu kostiju, a smanjenom broju metabolički aktivnih osteoklasta i osteoblasta (Rask-Andersen et al. 2012). Pinhasi i saradnici (2019) izneli su hipotezu da ovako stvorena sredina sa mineralizovanim osteocitima i zaštićenom pozicijom kohlee doprinose dugotrajnoj očuvanosti DNK.

spoljašnjeg ka unutrašnjem uhu. Za razliku od većine kostiju u ljudskom telu, a slično kohlei, njihova krajnja veličina i morfologija dostignuta je već po rođenju i nema promena nakon prve godine života (Sirak et al. 2020). Kao i petrozna kost, slušne koščiце su se pokazale kao odličan izvor jedarne i mtDNK, ali mogu biti podložnije kontaminaciji (Sirak et al. 2020). Važno je napomenuti da su koščiće takođe morfološki informativne u cilju utvrđivanja razlika metričkih i nemetričkih karakteristika roda Homo i razumevanja slušnih kapaciteta i evolucije slušnog aparata.

Kao izvor DNK mogu poslužiti i dlake (Gilbert et al. 2007; Rasmussen et al. 2010), nokti, pera, koprolići (Kuch and Poinar 2012), sedimenti (Haile 2012), i očuvani delovi biljaka poput semena, rizoma, polena (Kistler 2020).

Kosa (kao i drugi keratinski materijal - pero, rog i nokti) često se može naći na mumificiranim ostacima i u izuzetno hladnim sredinama poput permafrosta. Kosa je veoma otporna na degradaciju i kontaminante zbog hidrofobne prirode i strukture keratina (Gilbert et al. 2007; Rasmussen et al. 2010; Campos and Gilbert 2019). Zapaženo je da je DNK bolje očuvana u korenu (metabolički aktivni deo) i unutrašnjim slojevima kose od keratinizovanog dela kose (Bengtsson et al. 2012).

Koprolići predstavljaju mineralizovane fekalne ostatke koji se mogu pronaći na arheološkim nalazištima. Najčešće se koriste kao izvor drevne DNK mikroorganizama koji su nekada živeli u utrobi u cilju rekonstruisanja načina ishrane (Kuch and Poinar 2012) ili proučavanja diverziteta mikrobioma koji koevoluiraju sa domaćinom i na taj način može pružiti informaciju o zdravlju, ishrani i migracijama ljudi (Tito et al. 2008; 2012; Warinner et al. 2015). Protokol za izolaciju DNK iz koprolića drugačiji je u odnosu na izolaciju iz kosti budući da može doći do formiranja produkata koji su rezultat reakcije šećera u DNK lancu i amino grupa iz proteina (Pääbo et al. 2004). Rezultate ovih analiza treba pažljivo interpretirati jer koprolići mogu biti kontaminirani sredinskom DNK (Tito et al. 2012; Llamas et al. 2017).

Sedimenti su odličan rezervoar drevne DNK mikroorganizama, biljaka i životinja u različitim sredinama, a posebno u pećinama i permafrostu (Willerslev et al. 2003). Prilikom raspada organizama, DNK se vezuje za huminsku kiselinu i organsko-mineralne komplekse prisutne u zemljištu koji donekle štite od dalje degradacije (Haile 2012). Sredinska DNK se koristi kao dodatni alat u pružanju informacije o paleosredini i pređašnjim ekosistemima. Međutim, mora se imati na umu da kiseline iz zemljišta

blokiraju PCR amplifikaciju i da uzorak mora biti dovoljno veliki s obzirom na heterogenu prirodu zemljišta (Haile 2012).

Drevna DNK se takođe može izolovati iz muzejskih primeraka (Gilbert et al. 2007; Fulton et al. 2012), ukoliko nisu bili izloženi hemijskim agensima (npr. formalinom) u cilju bolje očuvanosti, jer hemikalije mogu inhibirati PCR amplifikaciju i dalje degradirati biomolekule.

Očuvani delovi biljaka (seme, polen, rizom, itd) mogu poslužiti kao izvor DNK molekula. Herbarijum je značajan izvor miliona vrsta, starih i oko 400 godina, koji može pružiti uvid u procese domestikacije i pod kojim selektivnim pritiscima je dolazilo do promene diverziteta flore (Kistler 2020). Makrofosili u arheobotanici (plod, seme, drvo) često su pronalazeni očuvani u ugljenisanom stanju, ali izolovanje DNK iz ovih uzoraka nije do sada bila uspešna. Nasuprot tome, odličnu očuvanost DNK pokazali su uzorci koji su brzo osušeni u suvim pećinama i sredinama. Kao i kod kopolita, protokol za izdvajanje DNK se razlikuje zbog prisutstva šećera, polifenola ili drugih sekundarnih produkata koji mogu biti PCR inhibitori (Kistler 2020).

1.3. Nova Generacija Sekvenciranja (NGS)

Sekvenciranje po Sangeru (Sanger et al. 1977), zajedno sa kapilarnom elektroforezom, omogućilo je dobijanje genetičke informacije iz bilo kog biološkog entiteta. Međutim, kako je i dalje postojao problem sa brzinom sekvenciranja, rezolucijom i količinom podataka, javila se potreba za razvojem nove, druge generacije sekvenciranja (Margulies et al. 2005; Bentley et al. 2008). Upotreba NGS metode u paleogenetici omogućila je sekvenciranje celih genoma iz veoma male količine arheoloških uzoraka¹⁹, a sama metodologija neprestano napreduje u cilju izolovanja i čitanja veoma kratkih fragmenata, proizvodnje velike količine podataka i smanjene cene sekvenciranja. Međutim, greška NGS metode je veća od sekvenciranja po Sangeru (Kircher and Kelso 2010, Racimo et al. 2016) i povećava se sa dužinom sekvenci zbog smanjene efikasnosti enzima (engl. *phasing effect*), što ima za posledicu dobijanje sekvenci nejednakih dužina, ograničenih na 36 do 150 bp (Metzker 2010).

¹⁹ Dok je ranije bilo potrebno odvojiti 1 g arheološkog materijala za ove analize, danas je potrebno samo 150 mg materijala za izolaciju drevne DNK (Stoneking and Krause 2011).

Većina protokola za izolaciju bazira se na silika kolonama i različitim modifikacijama sastava vezujućeg pufera, što je omogućilo uspešno izolovanje i veoma kratkih fragmenata DNK (od 30 do 60 bp) (Rohland and Hofreiter 2007; Gamba et al. 2016; Dabney et al. 2013²⁰; Meyer et al. 2014). Sekvenciranje kratkih fragmenata i uočavanje oštećenja tipičnih za drevnu DNK, omogućeno je dodavanjem univerzalnih dvolančanih adaptera na krajeve fragmenata u procesu pripreme biblioteke prajmera neophodnih za amplifikaciju i sekvenciranje. NGS metodom omogućeno je i sekvenciranje više uzoraka paralelno (engl. *multiplexing*) i dobijanje ogromne količine podataka za kratko vreme, čime je značajno smanjena cena sekvenciranja. Dodatno, u upotrebi su i mnoge metode za obogaćivanje endogene DNK u odnosu na sredinsku DNK i kontaminante (engl. *enrichment*), čime se takođe redukuju cena i vreme analiza.

Priprema uzoraka za sekvenciranje na *Illumina* platformi²¹ može se podeliti u nekoliko faza: 1. fragmentacija DNK fizičkom ili hemijskom metodom (pomoću specifičnih restrikcionih enzima). Ovaj korak je u studijama drevne DNK izostavljen s obzirom da je drevna DNK već degradovana na male fragmente; 2. priprema biblioteke; 3. formiranje klonalnih klastera i njihovo sekvenciranje; 4. analiza podataka koji se dobijaju sekvenciranjem (Mardis 2008; Metzker 2010; Kircher and Kelso 2010).

Priprema biblioteke podrazumeva dodavanje univerzalnih adaptera na sve DNK fragmente, kao i dodavanje različitih indeks sekvenci kako bi se uzorci sekvencirali paralelno na protočnoj ćeliji sekvenatora. Adapteri se najčešće dodaju na dvolančanu DNK (engl. *double-stranded library*) (Meyer and Kircher 2010; Orlando et al. 2013), te ovakva priprema biblioteke ne može da obuhvati sve molekule, jer je ligacija adaptera inhibirana na jednolačnoj DNK ili na DNK sa različitim modifikacijama baza. Iz ovog razloga priprema biblioteke na jednolačnoj DNK (engl. *single stranded library preparation*) postala je praksa za lošije očuvane ili veoma stare uzorke (Meyer et al. 2012). U ovom protokolu koraci prečišćavanja su preskočeni, a zajedno sa njima i gubitak fragmenata male dužine, jednolačanih molekula i informacije²², ali je sama metoda

²⁰ Dabney i saradnici (2013) uspeali su da izoluju kratke fragmente DNK od samo 50 bp pećinskog medveda starog skoro 300,000 godina sa istog arheološkog nalazišta u Španiji gde je pronađen i Sima de los Huesos (Meyer et al. 2014).

²¹ *Illumina* platforma je trenutno vodeća platforma u svetu za sekvenciranje zbog proizvodnje velike količine podataka po znatno manjoj ceni, kao i sekvenciranja kratkih fragmenata u studijama drevne DNK (<https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms.html>).

²² Procesi prečišćavanja su česti u protokolu i mogu dovesti do gubitka čak 16 % - 40 % uzoraka (Knapp

skuplja i vremenski zahtevnija (Meyer et al. 2012; Gansauge and Meyer 2013).

Da li će doći do sekvenciranja celih genoma (engl. *shotgun sequencing*) ili do obogaćivanja određenih delova genoma (mtDNK, određenih gena, regiona ili genetičkih markera) zavisi od očuvanosti uzorka, ali i istraživačkog pitanja. Sekvenciranje celih genoma predstavlja nasumično sekvenciranje cele DNK biblioteke čime se dobija informacija o kompletnom izolatu, kao i o distribuciji dužina fragmenata i potencijalnom nivou kontaminacije savremenom DNK, i primenjuje se kada je sadržaj endogene DNK visok jer se dobijene sekvence mogu efikasno mapirati na referentni genom (Knapp and Hofreiter 2010).

Metode obogaćivanja drevne DNK u odnosu na sredinsku DNK i kontaminaciju, primenjuju se kada sekvenciranje celih genoma nije ekonomično u slučaju loše očuvanosti uzoraka (Meyer et al. 2012). Ove metode se najčešće zasnivaju na “selektivnom zarobljavanju” regiona od interesa procesom hibridizacije sa prethodno dizajniranim oligonukleotidnim probama (engl. *baits*), pri čemu se “eliminiše” sva DNK koja nije predmet istraživanja (Fu et al. 2013; Enk et al. 2014). Ovakav korak zahteva amplifikaciju biblioteke pre hibridizacije kako bi se osigurao dovoljan broj molekula, kao i amplifikaciju obogaćene biblioteke nakon hibridizacije kako bi se omogućila dovoljna koncentracija DNK za sekvenciranje (Knapp and Hofreiter 2010). Na ovaj način može se analizirati kontrolni region mtDNK ili kompletna mtDNK (Maričić et al. 2010; Brotherton et al. 2013; Posth et al. 2016), određeni genetički markeri (Haak et al. 2015; Mathieson et al. 2015²³), egzomi (Burbano et al. 2010; Castellano et al. 2014), hromozomi (Fu et al. 2013), ili izolovati veoma mala količina endogene DNK (Carpenter et al. 2013; Enk et al. 2014). Međutim, i ova tehnologija ima svoje mane. Pored toga što DNK koja nije od interesa ne može biti potpuno eliminisana u najvećem broju slučajeva, ova metoda ne pruža mogućnost da se rekonstruišu nove varijante i delovi genoma s obzirom da su probe generisane u odnosu na referentni genom. U istraživanjima DNK anatomski savremenog čoveka i njegovih srodnika taj nedostatak najčešće ne predstavlja veliki problem, ali se javljaju problemi prilikom istraživanja genoma bakterija i virusa.

and Hofreiter 2010).

²³ Mathieson *i saradnici* (2015) su postavili standard za sekvenciranje 1,237,207 pojedinačnih nukleotidnih markera koji su informativni u populacionoj i funkcionalnoj analizi, i u kome se koriste probe komplementarne fragmentima koji okružuju ove markere (engl. *1240k capture*).

Velika količina podataka koja se dobija nakon sekvenciranja zahteva i složenu bioinformatičku analizu. Sekvence (engl. *reads*) dobijene nakon sekvenciranja predstavljaju identifikovane lance baza. Prvi i osnovni korak je identifikacija baze (engl. *base calling*), pri čemu se vrši i procena tačnosti identifikacije. Nakon otklanjanja adapterskih sekvenci i spajanja sekvenci koje su sekvencirane sa oba kraja DNK molekula, dobijene sekvence se poravnavaju na referentnim genomom (engl. *alignment*). Broj očitavanja jedne baze na određenom mestu u uzorku predstavlja dubinu ili pokrivenost sekvenciranja (engl. *coverage*) na tom lokusu, a prosečna dubina sekvenciranja celog genoma izračunava kao odnos između broja očitavanja (sekvenci) i njihove dužine sa dužinom genoma. Dubina sekvenciranja zavisi od dostupnosti materijala, cene, ali i istraživačkog pitanja. Tako će dubina sekvenciranja biti veća ukoliko se ispituju samo određeni delovi genoma, u slučaju korišćenja složenih demografskih modela, kao i za dobijanje epigenetičkih informacija (Metzker 2010) što vodi ka većoj pouzdanosti podataka, ali i višoj ceni analiza. Međutim, kada se analize rade za populacione studije, što zahteva sekvenciranje velikog broja uzoraka, genomi se sekvenciraju na manjoj dubini (ispod 1X), pre svega zbog cene i pouzdanosti dobijenih parametara u matematičkoj analizi.

1.4. Socijalna organizacija praistorijskih društava

1.4.1. Društveni status i evolucija socijalne nejednakosti

Pitanje pojave i razvoja institucionalizovane socijalne nejednakosti u društvu (engl. *permanent social inequality*), kao i načina na koji se ona održala u društvu (Fried 1967; Sahlins 1972; Ames 2007; Drennan et al. 2010; Price and Feinmann 2010; Mattison et al. 2016) spadaju u mnogobrojna pitanja socijalnih antropologa i arheologa. Naime, iako je različitost među ljudima u zajednici oduvek postojala, jasno je da je vremenom postalo opšte prihvaćeno da određeni resursi i socijalni položaji u ljudskom društvu nisu svima podjednako dostupni, već su dodeljeni na osnovu različitog porekla, pola ili godina (Ames 2007).

Kada se sagledaju pozicije članova i načina na koji su resursi i moć raspoređeni u društvu, mogu se razlikovati egalitarna i rangirana društva (Fried 1967). U egalitarnim društvima, iako nejednakost na osnovu pola, godina i sposobnosti pojedinaca postoji, ona

nije unapred predodređena i sve osobe imaju jednak pristup resursima i prestižnim pozicijama u društvu. Broj prestižnih pozicija u društvu je neograničen, prolazan i može ih zauzeti bilo koja osoba koja to zasluži (Fried 1967). Dakle, prestiž i autoritet se u ovakvim društvima stiču (npr. ulovom hrane) i održavaju deljenjem resursa sa svim članovima zajednice, čime pojedinac gradi i održava poštovanje i autoritet u društvu²⁴. Ekonomija u ovim društvima je uzajamna, velikodušnost se nagrađuje, te ne dolazi do akumulacije bogatstva (Ames 2007).

Pored egalitarnih društava, zabeležena su i rangirana i stratifikovana društva. U rangiranom društvu postoji jednak pristup resursima, ali ne i vrhovnim stalnim pozicijama u društvu. Pozicije moći više nisu neograničene, ne može ih svako dostići, ali one i dalje mogu biti zaslužene (engl. *achieved*) ili dodeljene rođenjem (engl. *ascribed*) (Bowles et al. 2010). Za razliku od rangiranih društava, u stratifikovanim društvima, pored različitog pristupa višem statusu u društvu, postoji i razlika u pristupu osnovnim resursima potrebnim za život, što se reflektuje u ishrani, zdravlju, dužini života, pa i u mogućnostima da se ostavi potomstvo (Fried 1967). U ovakvim društvima, mala grupa dominantnih pojedinaca (koje su sticajem okolnosti stekle pravo na određene resurse) akumulira bogatstvo i svojim ponašanjem ističe te razlike, pokazuje silu, a svoj autoritet i položaj moći zasniva na strahu ostatka populacije (Ames 2007).

Uobičajno je mišljenje da se evolucija društva odvijala od prostijeg egalitarnog oblika do složenijeg oblika (države), pri čemu se ova promena odigrava u jednom smeru u poslednjih 10,000, a posebno u poslednjih 5,000 godina (Richerson and Boyd 2000). Međutim, ovakav tok razvoja društva u kome egalitarni oblik predstavlja osnovno i početno društvo, dovodi se u pitanje jer upravo zbog nepostojanja stalne socijalne nejednakosti, egalitarni sistem zahteva visok nivo saradnje i težak rad među osobama, kao i aktivnu supresiju ambicije i pohlepe, velike kognitivne sposobnosti i visok moralni i etički kodeks (Fried 1967; Ames 2007)²⁵. Moguće je da se egalitarnost upostavila kao socijalna adaptacija u pleistocenu kada su klimatski uslovi bili veoma promenljivi, a

²⁴ Autoritet predstavlja sposobnost ljudi da "utiču" na ponašanje i mišljenje drugih ljudi u odsustvu moći i poslušnosti (Fried 1967; Ames 2007).

²⁵ S obzirom da ostali primati (šimpanze, bonobo i gorile) takođe imaju hijerarhijske sisteme, neki istraživači tvrde (Boehm et al. 1993) da egalitarno društvo nikada nije ni postojalo, već da su to zajednice koje čine osobe niskog statusa i koje donekle umanjuju moć osoba visokog statusa. Ovakvo ponašanje je naučeno i u populaciji bi se širilo brzo. Međutim, razvoj kognitivnih sposobnosti kod modernog čoveka omogućio bi i razvoj egalitarnih društava (Ames 2007).

društva manja i mobilna, te akumulacija bogatstva nije bila od koristi nijednom članu zajednice (Richerson and Boyd 2000; Ames 2007; Bowles et al. 2010).

Sa nastupanjem stabilnije klime, početkom holocena, dolazi do promena u načinu života i ekonomiji. Ove promene pre svega podrazumevaju sedentarni način života, domestikaciju biljaka i životinja, proizvodnju hrane i mogućnost njenog skladištenja. Veća dostupnost hrane omogućila je i porast broja članova zajednice, a samim tim i gustine naseljenosti, što dovodi do usložnjavanja međuljudskih odnosa, više interakcija i nesuglasica, pri čemu se javlja veća potreba za vođom i uređenim sistemom (Shennan 2018). Pojedinci u ovakvim okolnostima prvo dele resurse sa bližim članovima porodice, zbog čega rodbinski odnosi dobijaju na značaju. Kombinacija faktora, poput povećanog populacionog pritiska, promene u demografiji i ekonomiji, proizvodnji viška, specijalizacije rada, tehnoloških inovacija i mogućnosti kontrole nad određenim resursima, dovodi do promena i u društvenoj organizaciji i razvoja institucionalizovane socijalne nejednakosti (Fried 1967; Smith et al. 2010; Bowles et al. 2010; Mattison et al. 2016). Međutim, mora se napomenuti da pojava socijalne nejednakosti nije univerzalni obrazac, već varira od populacije do populacije, bez obzira na njenu brojnost, i rezultat je aktivnosti ljudi koji su nastanjivali različite životne sredine (Harding 2000).

Među glavnim pitanjima kada se proučava socijalna organizacija društva jeste na koji način je došlo do formiranja društva u kome većina ljudi predaje moć nekolicini ljudi, kao i na koji način su ove povlašćene osobe uspele da održe svoju poziciju u društvu (Earle 1987; Kristiansen and Larsson 2005; Kristiansen 2014). Jedna od pretpostavki je da su upravo porodične veze bile glavni mehanizam prenosa statusa i materijalnog bogatstva sa generacije na generaciju (Smith et al. 2010; Mattison et al. 2016). U složenim društvima, poput poglavarstva u bronzanom dobu, srodstvo, pol i brakovi postaju važni jer predstavljaju glavni način povezivanja na osnovu kojih se baziraju status osobe i nasleđivanje statusa, kao i veze unutar i između zajednica. Srodstvo omogućava vođi da raspoređuje bogatstvo, kontroliše radnu snagu i na taj način osigurava svoju poziciju (Harding 2000, Kristiansen and Larsen 2005).

S obzirom da za veći deo praistorije ne postoje pisani dokazi, vrlo je teško rekonstruisati socijalnu organizaciju drevnih zajednica. Ipak, socijalna nejednakost se može nagovestiti na osnovu razlika utrošene energije u nečije sahranjivanje (Binford 1971; O'Shea 1984; Carr 1995). Osnovna ideja prilikom ovih procena je da način

sahranjivanja, položaj tela i orijentacija, kao i količina uložene energije na sahranu pojedinaca (veličina i detalji na grobu, varijabilnost priloga) reflektuje socijalni status i ulogu preminulog pojedinca u društvu (Saxe 1970; Binford 1971; Ames 2007). Materijalni dokazi u arheologiji (npr. veličina građevina, kuća, groba i njihov sadržaj), kao i skeletni ostaci, mogu biti pokazatelji prisustva socijalne nejednakosti i bar delimično pružiti informaciju o strukturi praistorijskog društva. Tako, određene patologije, loša ishrana, težak fizički rad, manja telesna visina, i siromaštvo u grobnim priložima reflektuju niži status individue, dok su pojedinci za čiju je sahranu utrošeno dosta energije, verovatno uživale viši položaj u društvu. Međutim, stepen rangiranosti društva teško je proceniti i treba naglasiti da odsustvo pokazatelja rangiranog društva ne znači nužno da je društvo bilo egalitarno. Iz ovog razloga, studije socijalne evolucije zahtevaju veoma pažljivu interpretaciju rezultata, a pojedinci i njihov status ne smeju se posmatrati van konteksta nekropole (O'Shea 1996; Ames 2007).

1.4.2. Bronzano doba

Bronzano doba (2500 - 800 godine pre n.ere u Evropi) (Harding 2000) predstavlja period velikih kulturnih promena, koje pre svega karakteriše masovna produkcija i trgovina metalom, o čemu svedoče brojne pronađene metalne alatke, sekire i nakit. Metal je zahvaljujući svojoj čvrstini i dugotrajnosti pružio tehnološku prednost civilizacijama koje su ga koristile. Međutim, proizvodnja metala bila je ograničena na nekoliko delova Evrope, odakle su se sirovine dobro organizovanom i kontrolisanom trgovinom upućivale ka drugim zajednicama. To je dovelo i do uspostavljanja komunikacije između udaljenih mesta, veću mobilnost ljudi i relativno brzu razmenu ideja i znanja među populacijama (Kristiansen 2014, Müller 2017). Da bi se zaštitili putevi trgovine, pozicije moći i kontrole rudnih ležišta, došlo je do pojave vođa ili agresivnih i ambicioznih individua (Hayden and Villeneuve 2010), koji su međusobno formirali saveze najčešće formiranjem brakova (Kristiansen 1999; 2014). Iako je oružje često korišćeno samo kao način prikazivanja bogatstva, tragovi na pronađenom oružju (bodežima, mačevima i sekirama) u bronzanom dobu svedoče o njihovoj upotrebi i čestim sukobima. Upotreba oružja, zajedno sa domestikacijom konja i specijalizacijom rada, dovela je do veće kompeticije i češćih osvajanja, čiji su glavni uzroci bili rast populacije, ekološki nepovoljni uslovi i održavanje moći (Kristiansen 2014).

Bronzano doba karakterišu manje ili više složena poglavarstva, sa centrom moći oko starešine i njegove porodice, oko kojih se organizuje i održava ekonomija i ideologija zajednica. Iz ovog razloga, pretpostavlja se da je srodstvo igralo veoma važnu ulogu u organizovanju socijalne strukture društva, odnosno, da se socijalno politička hijerarhija formirala na osnovu porodičnih veza (Earle 1987).

Nova tehnologija i inovacije omogućile su kontrolu nad vrednosnim objektima i podelu rada, što je rezultovalo u akumulaciji materijalnog bogatstva i transformaciji društvenog i političko-ekonomskog sistema (Harding 2000; Kristiansen and Larsen 2005; Kristiansen 2014). Društva su nesumnjivo postala složenija: status i moć postaju veoma važni, a stratifikacija društva postaje očiglednija. Bronzano doba je specifično po tome što je nejednakost u društvu postala dovoljno izražena da bude primećena kroz materijalnu kulturu i sahranjivanje (Earle 1987; Harding 2000). Tako su prestižni predmeti bili raspoređeni na određeni način (npr. samo oko 5% grobova je sadržalo bronzu), dok se orijentacija groba muškaraca i žena jasno razlikuje prilikom sahranjivanja. Ovo su pokazatelji da su se društva pridržavala određenih pravila i da su uloge među polovima postale izraženije (Kristiansen 2014).

Upravo zbog izražene socijalne nejednakosti između pojedinaca i grupa u Evropi u bronzanom dobu (Harding 2000), ovaj period je od izrazite važnosti za studije socijalne evolucije i nejednake distribucije moći unutar jednog društva.

1.4.3. Genetička struktura Evrope za vreme bronzanog doba

Genetička struktura današnjih Evropljana rezultat je složenih procesa iz prošlosti. Jedna od velikih migracija anatomski savremenih ljudi obuhvatila je dolazak ranih famera sa Bliskog istoka u Evropu, pre oko 10-11,000 godina. Ovaj period označio je početak neolita i širenje poljoprivrede u Evropi. Poljoprivreda je preko Anadolije i Balkana stizala u Evropu dvema glavnim rutama: 1) uz reku Dunav ka srednjoj Evropi i 2) mediteranskom rutom ka Pirinejskom poluostrvu (Mathieson et al. 2018; Shennan 2018). Analize drevne DNK ukazale su da je prilikom migracije zemljoradničko-stočarskih zajednica dolazilo do njihovog mešanja sa lokalnim lovcima sakupljačima, kao i da se širenje poljoprivrede dešavalo procesom demičke difuzije (Bollongino et al. 2013; Haak et al. 2015; Hoffmanová et al. 2016; Mathieson et al. 2018).

Oko 3,000 god. pre n.e. došlo je do značajnijeg slabljenja neolitskih populacija. Najverovatniji uzrok opadanja brojnosti ovih populacija bila je pojava kuge (izazvana bakterijom *Yersinia pestis*) i njeno brzo širenje usled loših higijenskih uslova (Brandt et al. 2013; Rasmussen et al. 2015). Stabilnost neolitskih populacija dodatno je ugrožena velikom migracijom Jamne populacije oko 3,000 god. pre n.e. iz Azije u srednju i jugoistočnu Evropu²⁶, što je dovelo do postepenog nestanka neolitskih zajednica i uspostavljanju bakarnog, a potom i bronzanog doba (Kristiansen 2014). Za ovu populaciju nomadskih stočara iz pontskih stepa današnje Rusije vezuju se, u kulturnom kontekstu, nadgrobni spomenici (kurgani), individualno ili porodično sahranjivanje i dekorisanje tela crvenim pigmentom (Kristiansen et al. 2017). Bili su među prvim ljudima koji su koristili zaprežna kola, a moguće je da je upravo Jamna kultura donela i znanje o pripitomljavanju konja (Anthony 2013), kao i proto-indo-evropski jezik (Allentoft et al. 2015; Haak et al. 2015). Takođe, smatra se da su ljudi iz stepa bili veliki ratnici i dobro organizovani u osvajanju novih teritorija (Kristiansen et al. 2017). Širenje njihove tradicije doprinelo je napretku u komunikaciji, trgovini i tehnologiji, pa se kulturna razmena između populacija i transformacija civilizacija dešavala brzo dovodeći do drugačijeg načina života i socijalne reorganizacije porodice i društva.

Na osnovu arheoloških i genetičkih podataka poznato je da je Jamna populacija došla u kontakt sa tadašnjim Evropljanima (Allentoft et al. 2015). Populacione analize pokazale su relativno brze promene u genskom fondu, pri čemu je došlo do smanjivanja tzv. neolitske i paleolitske genetičke komponente u Evropi, dok se nova genetička komponenta iz stepa drastično povećala (Allentoft et al. 2015; Haak et al. 2015; Cassidy et al. 2016). Naime, po dolasku u Evropu, Jamna populacija je živela zajedno sa lokalnim Evropljanima koji vode poreklo od zemljoradničko-stočarskih populacija i populacija lovaca sakupljača iz ranijih perioda, pre poslednjeg ledenog doba, i za samo nekoliko stotina godina doprinela je velikim procentom genetičkom fondu ljudi u centralnoj Evropi (Allentoft et al. 2015; Brandt et al. 2015). Mešanje kultura u Evropi dovelo je do velikih demografskih i ekonomskih promena koje su vodile i ka formiranju novih kultura, poput

²⁶ Iako je uzrok velike migracije Jamne populacije i dalje nepoznat, takođe se pretpostavlja se da je do toga dovela pandemija kuge (Rasmussen et al. 2015; Knipper et al. 2017).

kulture vrpčaste keramike²⁷ (engl. *Corded Ware*) oko 2,800 god. pre n.e (Allentoft et al. 2015; Haak et al. 2015; Kristiansen et al. 2017).

Uporedo sa kulturom vrpčaste keramike, populacija zvonastih pehara²⁸, koja pokazuje najveću genetičku sličnost sa savremenim populacijama iz jugozapadne Evrope, naseljava centralnu Evropu i Iberijsko poluostrvo u eneolitu i ranom bronzanom dobu (2,600 - 1,800 godine pre nove ere) (Brandt et al. 2015). S obzirom da su se ove dve kulture preklapale u centralnoj Evropi tokom 300 godina, ova regija je važna za razumevanje interakcija i dinamike među kulturama. Oko 2,200 godine pre nove ere, rano-bronzana populacija Unjetička zamenjuje obe kulture (Brandt et al. 2015). Ove evropske, kasno-neolitske kulture i kulture bronzanog doba, poput kulture vrpčaste keramike, kulture zvonastih pehara, Unjetička, i populacija iz Skandinavije, iako su pokazivale visok stepen genetičke sličnosti, formiraju klinu genetičkog afiniteta prema Jamna populaciji. Najveću sličnost Jamna populacija deli sa kulturom vrpčaste keramike, a najmanju sa populacijama na teritoriji današnje Mađarske, dok se kultura zvonastih pehara i Unjetička populacija nalaze na sredini kline (Allentoft et al. 2015; Haak et al. 2015). Nasuprot rezultatima dobijenim za centralno evropske populacije, na Iberijskom poluostrvu nije pronađen genetički uticaj iz stepa u ovom periodu (iako postoje sličnosti između populacija kasnog neolita Iberijskog poluostrva i centralne Evrope kada se posmatraju brojni artefakti), te se zaključuje da je uticaj sa istoka dospeo u delove Iberijskog poluostrva u kasnijem periodu (Szécsényi-Nagy et al. 2017). Poreklo iz stepa ne detektuje se kod eneolitskih individua u jugoistočnoj Evropi, sa izuzetkom dve individue koje pokazuju poreklo iz stepa čak 2,000 godina ranije nego što je to očekivano (Mathieson et al. 2018). Uticaj Jamne kulture primetan je u malom intenzitetu za vreme ranog bronzanog doba, a najveći je u kulturama ljudi sa Balkana za vreme kasnog bronzanog doba (Mathieson et al. 2018). Sve analize, arheološke i genetičke, pokazuju da je tokom migracija ljudi dolazilo i do protoka gena i do prenosa kulture i znanja.

Genetičke analize ukazuju da su skoro sve savremene populacije manje genetički diferencirane od lokalnih grupa iz bronzanog doba u odnosu na populacije iz mezolita i

²⁷ Kulturu vrpčaste keramike karakterisale su sekire za borbu i novi tip specifične keramike (Kristiansen et al. 2017).

²⁸ Grobnice ove populacije odlikuju se zvonastim keramičkim šoljama, strelama, a povremeno su se mogli naći zlato, ćilibar i bronzani objekti.

neolita. Izuzetak tome su savremene populacije sa Sicilije i Sardinije koje pokazuju najniži međupopulacioni indeks fiksacije (F_{st}) sa neolitskim zemljoradničko-stočarskim zajednicama (Allentoft et al. 2015). Utvrđeno je da savremeni Evropljani vode poreklo i od drevnih populacija severne Evroazije (engl. *ancestral North Eurasians - ANE*), ali je ta genetička povezanost verovatno u vezi sa uticajem Jamna populacije u kojoj se takođe uočavaju genetičke komponente populacija severne Evroazije²⁹. Takođe, manje genetičke razlike postoje između savremenih populacija nego između drevnih populacija, tj. drevne grupe su bile genetički strukturisanije (Allentoft et al. 2015).

1.4.4. Arheološko nalazište Mokrin

Detaljno iskopavanje nekropole u Mokrinu trajalo je od 1958. do 1965. godine pod pokroviteljstvom Narodnog muzeja u Kikindi (Girić 1971). Girić (1971) u svojoj monografiji dokumentuje prostorni raspored ove nekropole, veličinu i orijentaciju grobova, položaj i pol pokojnika, kao i njihove grobne priloge. U tom periodu pronađeno je 312 grobova, a iskopavanja u 2020. godini dovela su do otkrića još tri groba. Smatra se da postoji još oko 50 - 100 neistraženih grobova.

Nekropola u Mokrinu nalazi se u mestu Lalina Humka, u području sela Mokrin, u blizini Kikinde u severnom Banatu. Pripada moriškoj kulturi koja predstavlja skup rano-bronzanodopskih zajednica i koja se prostirala na teritoriji južnoistočne Mađarske, zapadne Rumunije i severne Srbije, između reka Karaš na severu, Tise na zapadu i Zlatice i Galacke na jugu (Slika 1.8.). Brojna arheološka iskopavanja u blizini reke Maroš i Tise dovela su do otkrića i drugih naselja i nekropola moriške kulture - Perjámos, Pécska, Szöreg, Pitvaros, Deszk "A," Deszk "F", Ószentiván, Óbéba, Klárafalva, Tápé, Kiszombor, Rábé, Törökkanizsa (Girić 1971), a nekropola u Mokrinu predstavlja najveću među njima.

²⁹ Vrlo je verovatno da ova genetička komponenta potiče iz populacija istočnih lovaca sakupljača, a potom se pojavljuje i kroz Jamnu populaciju i populaciju vrpčaste keramike (Haak et al. 2015).



Slika 1.8. Geografski položaj nekropole u Mokrinu. Svetlije tačke predstavljaju ostala arheološka nalazišta moriške kulture i uključuju i naselja i nekropole.

Ukupno 57 radiokarbonskih datuma je publikovano za bronzanodopsku morišku kulturu (2,700 – 1,500 god. pre n.e.), čiji je vrhunac razvoja bio oko 2,000 god. pre n.ere (O'Shea 1992; O'Shea et al. 2019³⁰). Od dostupnih 57 datuma, šest datuma potiče sa Mokrina (Tabela 1.2.) i pripadaju rasponu od oko 2,100 – 1,800 god. pre n.e. (2,086 - 1,807 calBC), što je u korelaciji sa relativnom hronologijom ove nekropole (O'Shea 1992). Ovaj raspon služenja nekropolom u Mokrinu potvrđen je i dobijanjem još devet apsolutnih datuma (Tabela 1.2.) u saradnji Nacionalnog muzeja u Kikindi i Laboratorije za bioarheologiju u Beogradu (publikacija u pripremi).

³⁰ O'Shea i saradnici (2019) su objavili 33 nova datuma moriške kulture sa arheoloških nalazišta Szöreg, Ostojićevo, Semlac i Rabe koji pripadaju periodu ranog i srednjeg bronzanog doba (2,467 - 1,503 calBC). Izuzetak je uzorak sa Ostojićeva iz kasnog bronzanog doba (1,409 - 1,265 calBC) koji se mora tretirati sa posebnom pažnjom budući da je za datovanje uzorkovana kremirana kost (O'Shea et al. 2019).

Tabela 1.2. Apsolutni datumi za Mokrin. Prvih šest datuma je objavljeno u O'Shea (1996). Preostalih devet datuma biće objavljeno u saradnji sa Nacionalnim muzejom u Kikindi.

Laboratorijska oznaka	Kontekst	Nekalibrisani datum (B.P.)	SD	Kalibrisani datum (B.C.)	1 Sigma opseg
GrN-8809	Grob 259	3500	35	1807	1879-1737 B.C.
GrN-14181	Grob 237	3595	35	1922	2010-1831 B.C.
GrN-14180	Grob 227	3650	35	1992	2107-1927 B.C.
GrN-7977	Grob 52	3650	50	1990	2130-1920 B.C.
GrN-14178	Grob 110	3655	30	1991	2108-1938 B.C.
GrN-14179	Grob 208	3690	30	2086	2134-1974 B.C.
1 (5045)	Grob 39	3680	30	2070	2135-1985 B.C.
3 (5047)	Grob 82	3521	30	1839	1894-1774 B.C.
4 (5048)	Grob 92	3509	30	1827	1887-1772 B.C.
5 (5049)	Grob 104	3521	30	1834	1894-1774 B.C.
6 (5050)	Grob 159	3575	30	1925	2008-1885 B.C.
7 (5051)	Grob 163	3599	30	1955	2017-1901 B.C.
8 (5052)	Grob 171	3724	30	2114	2196-2041 B.C.
9 (5053)	Grob 240	3591	30	1945	2011-1897 B.C.
10 (5054)	Grob 279	3476	30	1805	1876-1746 B.C.

1.4.4.1. Sahranjivanje u Mokrinu

Sahranjivanje na Mokrinskoj nekropoli uglavnom je bilo individualno sa jasno definisanim grobovima. Ne postoji značajna razlika u dubini grobova za odrasle, ali su muški grobovi, srazmerno fizičkim karakteristikama, bili duži od ženskih. Pokojnici su sahranjivani u zgrčencu, na boku, i lica okrenutih ka istoku, a orijentacija groba i položaj tela zavisili su od pola pokojnika. Dok su muškarci polagani na levi bok sa glavom okrenutom ka severu, žene su polagane na desni bok sa glavom okrenutom ka jugu (Girić 1971; O'Shea 1996)³¹. Dečiji grobovi generalno su lošije očuvani, dok su grobovi dece mlađe od 3 godine vrlo retki, što može ukazivati i na poseban način ili posebno mesto njihovog sahranjivanja (O'Shea 1996).

Dokumentovani su i alternativni načini sahranjivanja u moriškoj kulturi, ali nisu svi prisutni na Mokrinu (tabela 1.3.). Grupni grobovi su veoma retki, a pretpostavljeno je da su osobe sahranjene u grupnim grobovima u srodstvu i da su neočekivano umrle u isto vreme usled nesreće, bolesti ili sukoba (O'Shea 1996). Grupni grob takođe može biti posledica ekonomskih mogućnosti porodice ili posebnog statusa u društvu. Na Mokrinu, prisutna su samo tri dvojna groba (grobovi 22, 257, 308) i jedan grob sa tri pokojnika

³¹ Primećeni su i određeni izuzeci od normativnog načina sahranjivanja, poput sedam skeleta u istočnom delu nekropole čija lica nisu okrenuta ka istoku (grobovi 138, 141, 153, 167, 270, 272, 278). Jedan skelet okrenut je ka zapadu (grob 193), a postoje i slučajevi kada su individue postavljene u među- orijentacijama (O'Shea 1996). Nije poznato da li su ova odstupanja bila namerna ili slučajna.

(grob 122) (Slika 1.9.) (Girić 1971).

Tabela 1.3. Tipovi sahranjivanja dokumentovani na nekropoli u Mokrinu. (Tabela modifikovana iz O'Shea (1996)).

Tip sahranjivanja	Opis	Broj grobova na Mokrinu
Alternativni položaj ³²	Ispruženo sahranjivanje	1
	Romboidalno sahranjivanje	3
	Parcijalno sahranjivanje	4
Grupni grobovi	Dvojni	3
	trojni	1
Simbolično sahranjivanje		5
Kremacija	raniji period nekropole	3
Mutilacija ³³	Promena na telu, tačnije ruku i nogu nakon smrti	41
Trepanacija ³⁴	Promene pre smrti individue	7
Normativno sahranjivanje		278

Uočeno je da je na nekropoli u Mokrinu sahranjeno znatno više žena, što može biti posledica umiranja muškaraca na velikim udaljenostima od doma usled trgovinskih aktivnosti ili sukoba³⁵. Normativni način sahranjivanja prati 92% sahranjenih muškaraca (67 od 73) i 97% sahranjenih žena (102 od 105) (O'Shea 1996).

Posmatrajući pažljivo tipove sahranjivanja i prostornu distribuciju grobova, u svom radu O'Shea (1996) iznosi hipotezu da proces odavanja počasti pokojniku reflektuje njegov socijalni status i položaj u društvu i da alternativno sahranjivanje odražava poseban socijalni status individue. Ovakvo posmatranje funerarne prakse omogućava da se pretpostavi socijalna diferencijacija unutar nekropole. Ipak, mora se imati u vidu da nisu svi aspekti funerarne prakse vidljivi u arheološkom nalazu, već je to samo jedan mali

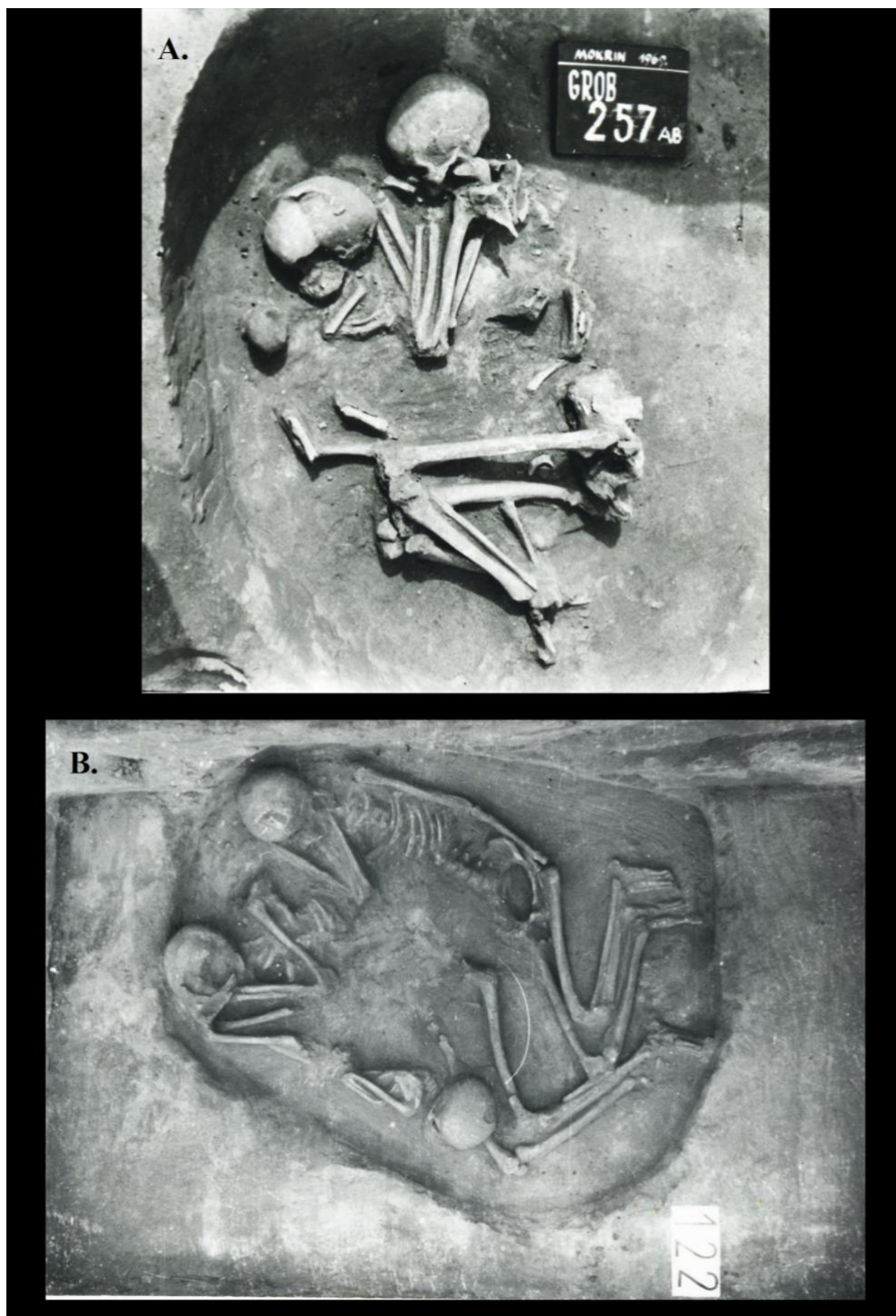
³² Zabeležene su tri kategorije alternativnih položaja sahranjivanja na Mokrinu: 1. ispruženo sahranjivanje deteta u duplom grobu 308, što je verovatno posledica viška mesta za dete i nepotrebnog zgrčenja, 2. "romboidni" položaj u kome je telo smešteno na leđa, sa nogama raširenim i savijenim u kolenima (grobovi 152, 260, 299), i 3. parcijalno sahranjivanje gde je telo u zgrčencu ali rotirano na taj način da leži ili na leđima ili na stomaku (grobovi 65, 79, 127, 184) (O'Shea 1996). Nije primećeno da postoje razlike u odnosu na pol.

³³ Dve individue imaju odsečene samo ruke, 26 individua stopala i postoje 13 slučajeva gde nedostaju i ruke i stopala. Mutilacija je bila jednako zastupljena među odraslima i decom, ali značajno više među muškarcima nego ženama i dokumentovana je samo u slučaju dobro očuvanih skeleta (O'Shea 1996).

³⁴ Trepanacija je proces koji se obavlja pre smrti, ali može označavati specifični status individue. Ova procedura karakteriše odrasle žene i muškarce, i nije zabeležena kod dece. Značenje ovog tretmana je i dalje nepoznato, ali moguće je da je služio za tretiranje ozbiljnih rana na glavi dobijenih u sukobu (O'Shea 1996) ili kao metod kojim bi se lečile osteoporotske degeneracije lobanje (Farkas and Liptak 1971).

³⁵ Pored oružja pronađenog u grobovima, dokazi da su postojali sukobi predstavljaju i rane na skeletima koje potiču od oštih predmeta (O'Shea 1996).

deo ceremonije koja takođe uključuje parametre koje je nemoguće kvantifikovati, poput oplakivanja, gozbe, dužine propovedi, itd.



Slika 1.9. Grupni grobovi. A. Dvojni grob 257 A i B. Tela su postavljena paralelno u zgrčencu, na desnoj strani. Lica su okrenuta ka istoku, dok su tela orijentisana u pravcu jugoistok - severozapad. Pripadaju manje očuvanom skeletu deteta (za koje je pretpostavljeno da je devojčica na osnovu načina sahranjivanja) i starijoj ženi, koja joj može biti baka. Ispred lobanje deteta nalazi se deo bikoničnog pehara. **B. Trojni grob 122.** Grupni grob 122 podseća na užu porodicu

sahranjenu u zgrčencu: odrasli muškarac 122S (sahranjen u orijentaciji žene), žena 122W i jedno dete 122E. Skelet E pripada dečaku, položenom na levi bok, licem okrenutim prema istoku. Orijetisan je u pravcu sever – jug. Ruke su savijene u laktovima i privučene grudima tako da su šake kod lica. Ispred grudi, postavljeni su grobni prilozci: kratka koštana igla, manja ogrlica (koju sačinjavaju delovi kosti, školjke, 9 bikoničnih i jedno oblo zrno od kaolina zelenkaste boje) i jedna fragmentovana naušnica od bronzane žice. Skelet S nalazi se u sredini rake (između skeleta E i W) i pripada odraslom muškarcu. Telo je postavljeno na levi bok, licem prema istoku u orijentaciji jug – sever. Ruke su savijene u laktovima sa šakama ispred brade. Fotografije: Nacionalni muzej, Kikinda.

1.4.4.2. Moriška naselja

Naselja moriške kulture građena su pored reka gde je samo određeni deo zemlje mogao biti suv i dostupan stanovnicima. To je vodilo ili ka većoj gustini naseljenosti na ovim predelima, ili su članovi zajednice bili primorani da naselja grade na brdima kako bi se zaštitili od poplava (Stefanović 2008).

Neki arheolozi smatraju da je moriška kultura pratila isti tip arhitekture i naselja kao kasno neolitske zajednice: centralni naseljeni deo okružen je manjim i kratkotrajnim naseljima između kojih nije dokazano da postoji jasno izražena razlika u funkciji i aktivnosti (Girić 1987). Međutim, za razliku od velikih, kasno neolitskih kuća, koje su verovatno bile dom većem broju porodica, kuće moriške kulture su naseljavale pojedinačne uže porodice. One su male (od 8-14 m u dužini i oko 4 m u širini), sa glinenim podovima, zidovima od pruća, i krovovima od trske, a njihovu unutrašnjost krasila su ognjišta, pećnice i prostor za okupljanje porodice. Važan deo ovih naselja bila su mesta za skladištenje hrane, kako unutar kuće, tako i izvan kuća (O'Shea 1996).

Groblje je takođe bilo sastavni deo naselja, a Mokrin sa 315 iskopanih grobova je najveće među njima i nalazi se u blizini pet moriških sela (Girić 1971). Iako je prvobitno smatrano da je svako naselje povezano sa jednom nekropolom, njihova lokacija ide u prilog pretpostavci da je jedno groblje moglo služiti za nekoliko zajednica (Girić 1987).

Bioarheološki ostaci govore nam da su se pripadnici moriške kulture bavili zemljoradnjom, uzgojem životinja, lovom i ribolovom u svakodnevnom životu. Uzgajala je ječam i sorte pšenice koje su uspevale na vlažnijem zemljištu (O'Shea 1996). Pronađeni su i mnogobrojni životinjski nalazi, među kojima dominiraju domaće životinje - svinje, goveda, ovce, koze i psi, a u manjoj meri ima i konja. Takođe, pronađeni su i ostaci crvenog jelena i dabra (Bokonyi 1972).

1.4.4.3. Materijalna kultura

Najznačajniji aspekt moriške kulture predstavlja keramika (činije, tegle, posude za tečnosti), među kojom se razlikuje fina keramika i keramika grube izrade. Dok je fina keramika zahtevala određenu veštinu za izradu, jer je pravljena po strogim dimenzijama i sa veoma preciznim detaljima, keramika od grube izrade je prostija, uglavnom obuhvata veće posude za skladištenje hrane i tečnosti, i mogla je biti proizvedena u svim domaćinstvima za svakodnevnu upotrebu (O'Shea 1996).

Drugi važan element ekonomije bila je metalurgija bakra i bronz, o čemu svedoče mnogi artefakti od ovih materijala (pre svega nakit, bodeži i sekire). Metalni artefakti najčešće su pronađeni u grobovima (retko kada u naseljima) gde su najverovatnije služili kao prikaz socijalnog statusa pojedinaca. Zlatni artefakti, poput prstenova ili nakita za kosu, takođe su pronađeni na moriškim nekropolama (O'Shea 1996; Stojanović 2021).

Značajna količina alatki, poput čekića, šila, igli, klinova, nakita, perli i privezaka, proizvedena je od životinjskih kostiju, zuba i rogova. Nasuprot tome, kamene alatke su retke i uglavnom predstavljaju sekire i brusilice. Takođe, tri vrste školjki, *Dentalium sp.*, *Cardium sp.*, i *Columbella rustica*, pronađene su među grobnim priložima i koristile se u proizvodnji perli (Ljuština et al. 2019).

Centralna pozicija moriških sela na reci predstavljala je pogodno i važno mesto za trgovinu, te pored dokaza za postojanje lokalne proizvodnje, postoje i mnogobrojni dokazi o uspostavljanju regionalne razmene materijalnih dobara između moriških sela i drugih kultura. Ova veza posebno je bila razvijena sa *Nagyrev* kulturom, koju karakteriše jedinstvenost u materijalnoj kulturi i sahranjivanju, a koja je predstavljala i vezu moriških sela sa severno nastanjenim zajednicama (O'Shea 1996). Odsustvo metalnih izvora³⁶ (zlata, bakra i kalaja potrebnog za izradu bronz) zahtevalo je uspostavljanje trgovinskih odnosa sa udaljenim mestima kako bi se nabavljale rude ili gotovi metalni artefakti. Takođe, specijalne regionalne radionice za izradu fine keramike, brojne nelokalne sirovine i prisustvo "egzotičnih" materijala (*Dentalium sp.* i *Columbella rustica* školjke;

³⁶ Analize elemenata artefakta pokazale su da bakar i bronza najverovatnije potiču sa dva izvora: 1. iz Slovačke i centralne Evrope, 2. iz Rumunije, dok zlato potiče iz istočnih izvora, tačnije Rumunskih Karata (O'Shea 1996).

keramika *Nagyrev* kulture ili metalni artefakti), nesumnjivo dokazuju da je postojala aktivna interakcija između moriških sela i drugih kultura (Ljuština et al. 2019).

1.4.4.4. Socijalna organizacija

Dok nam naselja mogu pružiti informacije o svakodnevnom životu zajednica, način na koji su individue sahranjene može nas informisati o socijalnoj organizaciji društva. Upravo je O'Shea (1996) predstavio analizu svih grobnih priloga sa moriških nekropola u cilju utvrđivanja društvene organizacije ove kulture. Na osnovu pola i starosti pokojnika, kao i prostorne distribucije određenih grobnih priloga, primetio je postojanje nasledne prirode različitog društvenog statusa osoba. Grobni prilozima (Slika 1.10.) poput oružja (bodeži i sekire)³⁷, pojasne niske³⁸, ukrasi za glavu³⁹ i koštane igle⁴⁰ variraju u zavisnosti od pola, godina i dela nekropole i smatrani su pokazateljima visokog društvenog statusa. Takođe, oznakama visokog društvenog statusa smatrani su i "egzotični" grobni prilozima, koji vode poreklo iz udaljenih mesta. Najsiromašniji članovi društva i članovi koji su imali niži društveni status sahranjeni su bez priloga ili samo sa keramičkom posudom ili nekoliko perlica (O'Shea 1996; Stefanović 2008). Takođe je zapaženo da markeri visokog statusa, pronađeni kod muškaraca, nisu proizvedeni lokalno, već su obezbeđeni trgovinskom razmenom, dok su žene (izuzimajući ukrase za glavu) sahranjene sa pojasnim niskama i koštanim iglama proizvedenim od lokalnih materijala (kaolin, keramika, životinjske kosti i zubi) (O'Shea 1996).

S obzirom da su bogati prilozima (izuzev ukrasa za glavu kod žena) nalaženi i kod dece, pravo na njihovo nošenje verovatno je bilo nasledno. Takođe, mali broj vrednosnih priloga ukazuje da je broj osoba koji su ih mogli posedovati verovatno bio ograničen

³⁷ Pronađeno je šest bodeža kod odraslih muškaraca u južnom delu nekropole, i dve metalne i četiri kamene sekire kod odraslih muškaraca u severnom delu nekropole na Mokrinu.

³⁸ Pojasne niske, sačinjene od različitih perlica i životinjskih zuba, obmotavane su oko struka starijih žena. U slučaju mlađih žena, pojasne niske bile su smeštene pokraj individue, a samo je u jednom slučaju mlađa ženska individua nosila svoj pojas. Nađene su u severnom i severno-zapadnom delu nekropole (O'Shea 1996).

³⁹ Ukrasi za glavu na Mokrinu pronađeni su kod žena srednjih godina, ali i kod nekih muškaraca. Samo jedan dečji grob (161) posedovao je ovaj prilog. S obzirom da ukrasi za glavu nisu pronađeni kod starijih žena, pretpostavlja se da je to ukrašavanje moglo pokazivati privremeni socijalni status, a ne trajnu zasluženu poziciju u društvu. Jedna od pretpostavki je da su ga nosile supruge ili sestre muškaraca visokog statusa (O'Shea 1996).

⁴⁰ Koštane igle su proizvedene lokalno i deo su grobnih priloga odraslih i mlađih žena u južno-istočnom delu nekropole u Mokrinu. Dok se kod mlađih individua nalazila jedna koštana igla, pokraj odraslih se mogao naći par (O'Shea 1996).

(O'Shea 1996).



Slika 1.10. Grobni prilozi uzorkovanih individua. a. bodež (grob 211), b. sekira (grob 163), c. sekira (grob 243), d. ukras za glavu (grob 161), e. ogrlica (grob 122S), f. pehar (grob 181), g. pehar (grob 163), h. pehar sa finijim radom (grob 282), i. činija (grob 163), j. pojasna niska (grob 161).

O'Shea (1996) je na osnovu istraživanja grobnih priloga i procenjene veličine populacije pretpostavio da su sela moriške kulture bila autonomna, ali isuviše mala za samostalno preživljavanje, te su se verovatno udruživala putem srodstva i uspostavljala regionalnu organizaciju koja nije bila strogo hijerarhijska. Određena socijalna i politička organizacija u ovim zajednicama je postojala, ali uniformno sahranjivanje članova zajednice na jednom mestu, kao i odsustvo građevina, ne sugerišu veće društvene promene karakteristične za bronzano doba.

Porčić i Stefanović (2009) posmatrali su fizičke markere stresa na individama kako bi procenili vezu između intenziteta fizičkih aktivnosti pojedinaca i njihovog socijalnog statusa, i kako bi utvrdili da li je društvo u Mokrinu (kao i većina društava u bronzanom dobu) bilo stratifikovano. Zapaženo je da su fizički aktivniji i snažniji muškarci (sa izuzetno izraženim mišićnim pripojima) sahranjivani sa bogatim priložima, te se smatra da su oni svoj status sticali u društvu, na primer ratovanjem. Sa opadanjem znakova fizičke aktivnosti opada i broj muškaraca sahranjenih u bogatim grobovima. Među pokojnicima koji su imali najmanje ispoljene mišićne pripoje nema nijednog koji je sahranjen u grobu sa markerima visokog statusa ili u grobu bogatom priložima. Nasuprot njima, sa smanjenjem dokaza fizičkih aktivnosti kod žena rastao je i njihov status. Žene sa više priloga nisu radile i najverovatnije su svoj status sticale preko udaje. Pripadnice ženskog pola koje su imale najizraženije mišićne pripoje najčešće su sahranjivane u najsiromašnijim grobovima (tj. onim bez priloga). Međutim, postoje određeni izuzeci jer je bilo i žena koje su za života obavljale izrazito teške fizičke poslove, a bile su sahranjene sa markerima visokog društvenog položaja. Stoga, nije isključeno da je promena statusa žena bila moguća, tj. prelazak iz nižeg u više društvo usled raznih životnih situacija (Porčić and Stefanović 2009). Prema rezultatima analize, ponuđena je interpretacija da je nasleđeni društveni status nekim ženama omogućio izbegavanje teških fizičkih poslova, dok su žene nižeg statusa obavljale teže poslove. Kod muškaraca je slika drugačija – izgleda da oni koji su rođenjem stekli viši društveni status nisu bili pošteđeni teškog fizičkog rada, već da je fizička aktivnost bila izuzetno važna za održavanje visokog društvenog položaja (Stefanović 2008).

1.5. Funkcionalni markeri

Prirodna selekcija predstavlja proces u kome određena osobina koja dovodi do veće adaptivne vrednosti individue u datim uslovima postaje češća (pozitivna selekcija), dok osobina koja svojim nosiocima smanjuje adaptivnu vrednost postaje manje zastupljena u sledećim generacijama (negativna selekcija). Selekcija deluje samo na postojeće fenotipske varijante u populaciji i dovodi do promena učestalosti alela na genima koji imaju efekat na preživljavanje i reprodukciju svojih nosilaca. Smanjena genetička varijabilnost na određenom lokusu usled delovanja selekcije unutar pojedinačnih populacija odražava se na veću diferenciranost između populacija.

Istraživanja efekata prirodne selekcije zasnivaju se na analizama tzv. funkcionalnih markera, tj. onih delova genoma čija uključenost u razviće fenotipa i postojanje različitih varijanti na tim lokusima imaju efekte na diferencijalno preživljavanje i reprodukciju jedinki u populaciji. Pronalaženje takvih, selektivno prepoznatljivih markera, pruža mogućnost opisivanja genetičkih promena koje su omogućile prilagođavanje ljudi na različite životne sredine (selektivne pritiske) u prošlosti. Selekcija ne utiče isključivo na promene učestalosti alela kodirajućih gena, već i na regulatorne delove genoma, koji dovode do varijabilnosti u ekspresiji gena. S obzirom na činjenicu da se za mali broj osobina može reći da se u njihovoj razvojnoj osnovi nalazi aktivnost jednog gena (monogenske osobine), a da su poligenska priroda i interakcije između više gena pre pravilo nego izuzetak u razviću najvećeg broja fenotipskih karakteristika, čitav set gena i signalnih puteva koji se moraju analizirati komplikuju istraživanje fenotipske evolucije (Daub et al. 2015).

Prilikom pronalaženja markera kandidata za analizu prirodne selekcije, identifikuju se aleli sa neobično malom starošću za ustanovljene visoke učestalosti u populaciji (Wilde et al. 2014). Jedan od uslova jeste i pretpostavka o kontinuitetu populacije na istom geografskom području i odsustvo strukturiranosti populacije (Wilde et al. 2014). Mathieson i saradnici (2015) analizirali su regione genoma koji odstupaju od uobičajne učestalosti genetičkih komponenti poreklom od istočnih zemljoradničko-stočarskih zajednica, zapadnih lovaca sakupljača i populacija iz stepa, pretpostavljajući da se takva odstupanja dešavaju ukoliko je taj deo genoma pod pozitivnom ili balansnom selekcijom. Prilikom ove analize, identifikovani su lokusi asociirani sa depigmentacijom i tolerancijom na laktozu (*LCT*, *SLC45A2*, *SLC24A5*, *HERC2*), koji su zatim proučavani

u drevnim genomima i poređeni između populacija (Mathieson et al. 2015). S obzirom da drevna DNK često nije dovoljno očuvana, mora se imati u vidu da je procena heterozigotnosti u ovim studijama ograničavajuća.

1.5.1. Pigmentacija

Pigmentacija pokazuje kontinuiranu varijabilnost i rezultat je aktivnosti međusobne interakcije gena uključenih u razviće kože, dužice i dlake. Učestalost različitih alela varira između populacija i zavisi od spoljašnje sredine, tj. geografskog područja. Tako je tamna koža karakteristična za toplije krajeve, gde ima ulogu zaštite od UV zračenja i na taj način predstavlja ekološku adaptaciju. Nasuprot tome, u hladnijim područjima, gde je nizak intenzitet sunčeve svetlosti i posledično je u ljudskom telu smanjena sinteza vitamina D3 i apsorpcije Ca^{2+} , formiranje kostiju i imunitet su oslabljeni i poremećeni i povezani sa srčanim oboljenjima i rahitisom (Chaplin and Jablonski 2009; Marciniak and Perry 2017). Kako u koži sa povećanjem koncentracije melanina⁴¹ opada apsorpcija UV zraka neophodna za sintezu vitamina D, sa povećanjem geografske širine (tj. smanjenjem intenziteta svetlosti) raste selektivni pritisak koji favorizuje svetliju boju kože - na taj način se omogućava sinteza dovoljne količine vitamina D i izbegava se pojava patoloških stanja (Chaplin and Jablonski 2009; Wilde et al. 2014; Ju and Mathieson 2021). Promena ishrane nakon neolita takođe je mogla doprineti favorizovanju svetlije kože u Evropi. Naime, ishrana u mezolitu bogata ribom i vitaminom D postepeno je zamenjivana žitaricama koje sadrže mnogo manje ovog vitamina (Marciniak and Perry 2017).

Iako opisane promene mogu objasniti evoluciju depigmentacije kože, postavljeno je pitanje uslova i razloga povećanja učestalosti svetlih očiju i kose. Jedna od hipoteza koja je ponudila objašnjenje mehanizma ovakvog trenda promene boje očiju vezuje se za dobro poznat fenomen u evolucionoj biologiji - seksualna selekcija zavisna od učestalosti. Naime, retka fenotipska svojstva mogu biti percipirana kao seksualni atraktanti i

⁴¹ Melanin predstavlja derivat aminokiseline tirozina koji nastaje aktivnošću enzima tirozinaze i odgovoran je za pigmentaciju životinja. Kod ljudi se javlja u dve forme: eumelanin (braon i crna boja) i feomelanin (crvena i žuta boja). Sintetisan je u melanozomima, organelama koje su locirane u melanocitima u nekoliko tkiva uključujući osnovni sloj epidermisa, folikule dlake i dužicu. Varijacija u pigmentaciji zavisi od razike u veličini i tipu melanina, kao i od distribucije melanozoma u različitim tkivima, i genetički je određena (Chaplin and Jablonski 2009; Wilde et al. 2014).

favorizovana prilikom odabira partnera za reprodukciju, pa se smatra da je pojava svetlih očiju usled mutacije u *OCA2* genu, koja je na početku svog nastanka svakako bila retka, mogla biti proširena kroz populacije usled češćeg i uspešnijeg ukrštanja ljudi sa tom retkom osobinom (Wilde et al. 2014). Postoji i hipoteza da su plave oči favorizovane u prošlosti, dok su bile retko svojstvo, da bi muškarci lakše verovali u sopstveno očinstvo (Laeng et al. 2007).

Treba imati na umu da na osnovu drevnih genoma nije moguće sa apsolutnom preciznošću odrediti boju kože budući da često nedostaju podaci na nekim pozicijama u dosta oštećenim DNK molekulima, pa se zaključci o svetloj ili tamnoj koži predstavljaju u opsezima određenih verovatnoća (Chaitanya et al. 2018). Danas je poznato nekoliko genetičkih markera koji se smatraju odgovornim za depigmentaciju kože i čija se učestalost menjala kroz vreme pod delovanjem selekcije, a danas su ili fiksirani ili imaju visoku učestalost među Evropljanima (Marciniak and Perry 2017; Ju and Mathieson 2021). Izvedeni aleli gena *SLC45A2*, *SLC24A5*, *TYR* i *HERC2*, povezani sa depigmentacijom kože, učestvuju u pigmentaciji kože poligenski, ali nije poznato da li je svaki od ovih alela bio pod delovanjem selekcije i u kom vremenskom periodu (Ju and Mathieson 2021).

Pigmentacija praistorijskih populacija Evrope uglavnom se razlikovala od pigmentacije populacija savremenih ljudi na istom geografskom području. Učestalost alela za tamnu pigmentaciju značajno je opala tokom poslednjih 40,000 godina (Ju and Mathieson 2021). Analize genetičkih markera na drevnim genomima pokazale su da su ljudi u paleolitu (50–20,000 godina pre nove ere) imali tamnu kožu, baš kao i neandertalci i Denisova arhaični ljudi (Marciniak and Perry 2017; Ju and Mathieson 2021). Takođe, mezolitski lovci sakupljači nosili su manje alela za svetliju kožu u poređenju sa ranim zemljoradničko-stočarskim zajednicama ili populacijama iz stepa (Olalde et al. 2014; Ju and Mathieson 2021). Smatra se da su svetlija koža, kosa i oči bili još uvek intenzivno favorizovani prirodnom selekcijom u periodu pre oko 6,500–4,000 godina, što sugerise da su selekcionarni pritisci uzrokovani slabijim sunčevim zračenjem i dalje bili aktuelni za vreme kasnog plesitocena i ranog holocena, ili da su se u novoj sredini pojavili novi selekcionarni pritisci koji su takođe favorizovali depigmentaciju (Olalde et al. 2014; Wilde et al. 2014).

HERC2 gen predstavlja glavnu determinantu pigmentacije dužice

(braon/plava), a takođe je povezan i sa pigmentacijom kože i kose. Njegov recesivan izvedeni alel rs12913832 A>G povezuje se sa pojavom svetlih očiju. *HERC2* gen nalazi se uzvodno od promotora *OCA2* gena, i s obzirom da ima ulogu u regulaciji ekspresije *OCA2* gena, oni zajedno učestvuju u determinaciji boje očiju (Branicki et al. 2009). *OCA2* gen je lociran na dugom kraku hromozoma 15 i smatra se da takođe reguliše proizvodnju melanina na taj način što kodira za transmembranski protein melanozoma (protein P) koji je uključen u transport i procesuiranje tirozinaze, i učestvuje u regulaciji pH melanozoma i metabolizmu glutationa (Donnelly et al. 2012). Mutacije u ovom genu dovode do okulokutanog albinizma tipa 2, retkog genetičkog oboljenja koje se nasleđuje autozomno recesivno i dovodi do nemogućnosti sinteze melanina u koži, kosi i očima. Ekspresija *OCA2* gena povećana je u melanocitima koji nose predački A alel *HERC2* gena, a utišana u melanocitima koji imaju izvedeni G alel. Homozigotni AA, kao i heterozigotni AG genotipovi na *HERC2* genu najčešće su prisutni kod osoba sa braon očima, dok se homozigotni GG genotip nalazi kod plavookih ljudi. Zanimljivo je da je u nalazu ljudske individue iz mezolita, označene kao *La Braña*, pronađena varijanta *HERC2* markera asocirana sa plavim očima, iako u mezolitu selekcija za svetlu kožu još uvek nije fiksirala odgovarajuće alele na drugim genima, što upućuje na zaključak da je selekcija za svetle oči mogla prethoditi selekciji za svetlu kožu (Olalde et al. 2014).

Dva markera *SLC45A2* i *SLC24A5* nalazila su se pod jakom selekcijom koja je favorizovala ove alele oko 19,000–11,000 godina pre nove ere (Wilde et al. 2014). Njihova učestalost rasla je relativno brzo u ranom neolitu u Evropi, verovatno i zahvaljujući migracijama (Wilde et al. 2014; Ju and Mathieson 2021). *SLC45A2* (rs16891982 C>G) alel uključen je u procese distribucije i intraćelijskog procesovanja tirozinaze i drugih enzima važnih za pigmentaciju. Izvedeni rs16891982*G alel, čija učestalost opada od severa ka jugu u Evropi, asociran je sa svetlijom kožom, kosom i očima kod savremenih populacija (Wilde et al. 2014). Izvedeni alel markera *SLC24A5* (rs1426654*A ili A111T), takođe povezan sa depigmentacijom kože kod Evropljana, skoro je fiksiran među ranim zemljoradničko-stočarskim zajednicama i populacijama iz stepa (Ju and Mathieson 2021). U analizi 104 genetičke varijante asocirane sa važnim fenotipskim osobinama, uočeno je da upravo ova dva pojedinačna nukleotidna polimorfizma (rs1426654 i rs12913832) pokazuju brzo povećanje učestalosti za vreme bronzanog doba u Evropi (Allentoft et al. 2015). Učestalost rs1426654 povećava se od

veoma niske do fiksacije u periodu od svega 3,000 godina između mezolita i bronzanog doba u Evropi (Allentoft et al. 2015).

TYR gen (rs1042602 C>A) kodira za tirozinazu, enzim koji katalizuje prva dva koraka u procesima melanogeneze, te je važan za proizvodnju melanina. Izvedeni A alel je asociran sa svetlom bojom kože i očiju, kao i odsustvom pega, a visoko je polimorfan kod Evropljana (Wilde et al. 2014).

1.5.2. Tolerancija na laktozu

Tolerancija na laktozu, disaharid prisutan u mleku (engl. *lactase persistence - LP*), predstavlja autozomnu dominantnu osobinu kontinuirane produkcije enzima laktaze i u odraslom dobu. Enzim laktaza hidrolizuje laktozu na glukozu i galaktozu, šećere koji se potom mogu apsorbovati i koristiti. Kod svih sisara, sinteza enzima laktaze prestaje nakon perioda odojčeta, pa stoga odrasle jedinke sisara ne mogu konzumirati mleko u ishrani jer ono dovodi do dijareje i dehidracije. Tolerancija na laktozu u odraslom dobu nije bila prisutna kod čovekovih predaka, baš kao ni kod drugih odraslih sisara.

Kod Evropljana, tolerancija na laktozu povezana je sa tranzicijom C u T u intronu *MCM6* gena (13,910*T) na hromozomu 2 (2q21), lociranim 13.91 kb uzvodno od gena za laktazu (*LCT*) (Enattah et al. 2002). Ovaj alel, takođe poznat kao rs4988235 (G>A), utiče na mogućnost vezivanja transkripcionog faktora AP-2 i promotorsku aktivnost ovog gena. Analize su identifikovale još jednu promenu u intronu *MCM6* gena povezanu sa mogućnošću varenja laktoze u odraslom dobu: G/A-22018, lociranu 22 kb uzvodno od *LCT* gena (Enattah et al. 2002). Ove dve varijante u *MCM6* genu međusobno su udaljene oko 8 kb i locirane između dva mikrosatelita D2S3013 i D2S3014 (Slika 1.11.). Homozigoti za C i G alel asocirani su sa netolerancijom na laktozu, dok su heterozigoti i homozigoti za T i A alel povezani sa sposobnošću varenja mleka (Enattah et al. 2002).

Učestalost alela koji omogućavaju toleranciju na laktozu zavisi od geografskog područja koje naseljava ljudska populacija. Savremeni ljudi iz severne Evrope imaju visoku učestalost rs4988235*A alela (čak 73–95% Britanaca i Skandinavaca), što je u korelaciji sa manjim brojem sunčanih dana u godini i nedovoljnom sintezom vitamina D u koži, a koji je neophodan za apsorpciju Ca²⁺. Visoka učestalost ovog alela takođe je karakteristična za zapadnu i centralnu Evropu (56–67%), kao i za određene grupe iz Afrike, sa srednjeg istoka, ili južne Azije koje se bave stočarstvom (Itan et al. 2009;

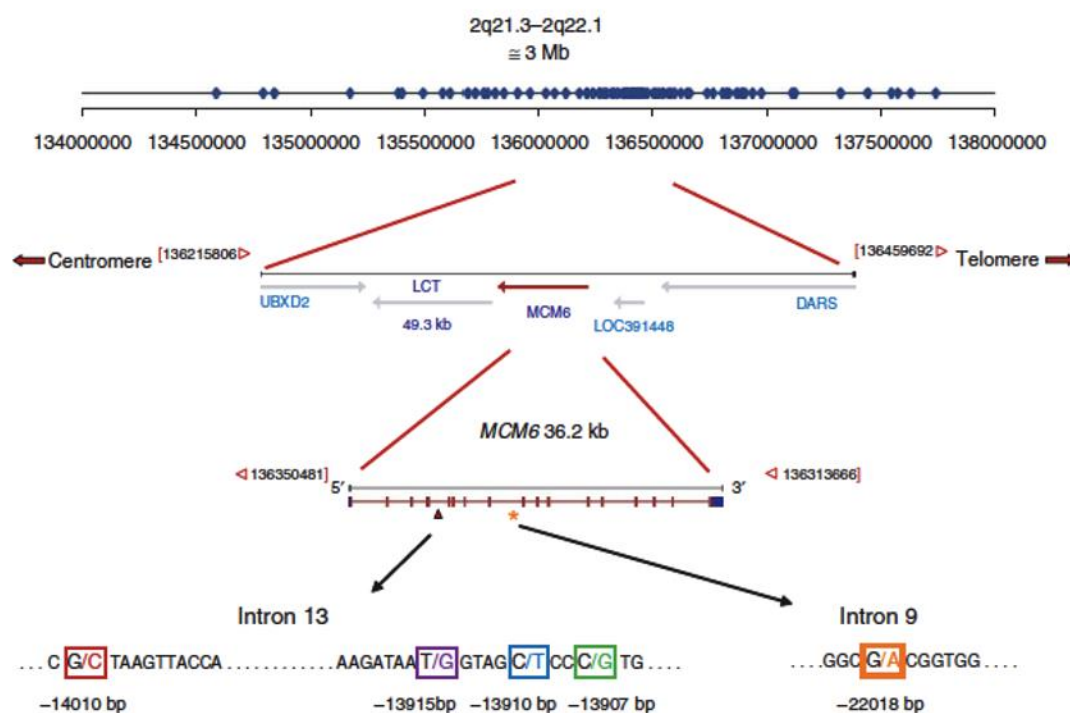
Campbell and Tishkoff 2010). Međutim, tolerancija na laktozu vrlo je retka u drugim ljudskim populacijama, npr. samo 6–36% u južnoj Evropi (Itan et al. 2009). Kultura i navike ljudi u ovim krajevima su drugačiji i mlečni proizvodi se uglavnom koriste u formi jogurta, sira i kefira.

Smatra se da je određena kombinacija spoljašnjih faktora odgovorna za povećanje učestalosti alela za laktoznu toleranciju od neolita do savremenog doba. Pre svega, mleko predstavlja važan izvor nutrijenata u odsustvu hrane i obezbeđuje dovoljnu količinu vitamina D i Ca^{2+} (Flatz and Rothauwe 1973), a predstavlja i važan izvor tečnosti na mestima sa suvom klimom ili kontaminiranom vodom (Cook 1978). Takođe je pokazano da mleko ima ulogu u suzbijanju simptoma malarije (Cordain et al. 2012) i poboljšanju sastava stomahnog mikrobioma (Cederlund et al. 2013; Gibson et al. 2017).

Širenje LP alela je pored selektivnih prednosti koje nosi sa sobom, takođe zavisno i od migracija predašnjih populacija, pre svega migracije ranih zemljoradničko-stočarskih zajednica iz Grčke preko Balkana Dunavskom rutom (Hoffmanová et al. 2016). Međutim, utvrđeno je da nisu isti aleli odgovorni za rezistenciju na laktozu kod Evropljana (i nekoliko zapadno-afričkih stočarskih populacija) i kod populacija iz Afrike i sa Bliskog Istoka, gde su identifikovana još tri postojeća polimorfizma (G/C-14010 u Tanzaniji i Keniji, a T/G-13915 i C/G-13907 u severnom Sudanu i Keniji), locirani oko 14 kb uzvodno od ovog gena (Tishkoff et al. 2007). Dakle, u Africi, postoji najmanje četiri alela povezanih sa tolerancijom na laktozu (tri su verovatno afričkog porekla, dok je alel 13,910*T evropskog porekla), što je zanimljiv primer konvergentne evolucije (Tishkoff et al. 2007).

Još uvek nije poznato poreklo dominantnog evropskog LP alela. Analize drevnih populacija pokazale su da je ovaj alel redak ili odsutan među ranim zemljoradničko-stočarskim zajednicama iz centralne i istočne Evrope (Burger et al. 2007), što podržava hipotezu o povećanju učestalosti tek nakon što je mleko uvedeno u ishranu. Analizom distribucije ovog alela među drevnim populacijama, procenjena je starost ove varijante kod Evropljana na vreme između 7,450 i 12,300 godina, kada je započeta praksa zemljoradnje (Itan et al. 2009). Jedna od pretpostavki porekla ovog alela podrazumeva da je mutacija nastala u populaciji smeštenoj između centralne Evrope i severnog Balkana u vreme već započete povećane proizvodnje mlečnih proizvoda i gajenja stoke, kada je pokrenuta intenzivna selekcija koja je za kratko vreme podigla učestalost alela počevši

od svega par jedinki nosilaca (Itan et al. 2009). Zapravo, evolucioni modeli predviđaju inicijalno sporo povećanje učestalosti alela dok je on jako redak u populaciji, ali se može očekivati da njegova učestalost naglo poraste usled demografskih ekspanzija i međusobno zavisnog procesa biološke i kulturne evolucije, jer je sposobnost konzumiranja mleka, kao važnog izvora nutrijenata i tečnosti, pružala određenu selektivnu prednost (Itan et al. 2009). Allentoft *i saradnici* (2015) smatraju da je povećanje učestalosti alela asociiranog sa genom za toleranciju na laktozu najverovatnije skorijeg datuma, s obzirom da je ova varijanta prisutna sa malom učestalošću u bronzanom dobu (Burger et al. 2007; Allentoft et al. 2015; Mathieson et al. 2015; Olalde et al. 2018; Mittnik et al. 2019), kao i da poreklo ove varijante potiče od stepskih populacija i njihove migracije u Evropu (Allentoft et al. 2015).



Slika 1.11. Mapa regiona *LCT* i *MCM6* gena. Prikazana je lokacija pojedinačnih nukleotidnih polimorfizama u intronu 9 i 13 *MCM6* gena u Afričkim i Evropskim populacijama. (Slika preuzeta iz Tishkoff *i saradnici* (2007)).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Osnovne pretpostavke od kojih se polazi u ovom radu podrazumevaju da materijalni i skeletni dokazi iz drevnih nekropola mogu pružiti informacije o životu svakog pojedinca, kao i da položaj i način sahranjivanja govori o statusu koji je osoba imala u zajednici. Uzimajući u obzir ove podatke, moguće je uobličiti znanja o socijalnoj organizaciji praistorijskih društava.

Nekropola u Mokrinu, u blizini Kikinde, pripada rano-bronzanodopskom periodu koji karakterišu intezivne društvene i ekonomske promene. S obzirom na bogatstvo pronađenih skeleta i grobnih priloga tokom iskopavanja, ova nekropola je od posebnog značaja za studije društvene organizacije. Analize drevne DNK pažljivo izabranih skeleta sa ove nekropole imaju za cilj utvrđivanje srodstva između sahranjenih individua, a zatim i odnosa između njihovog društvenog statusa i srodstva kako bi se definisala društvena organizacija ove drevne zajednice. Uzimajući u obzir analizu odgovarajućih genetičkih markera, podatke iz pređašnjih istraživanja na ovoj nekropoli (O'Shea 1996; Porčić and Stefanović 2009), kao i raznovrsne antropološke i arheološke informacije, ciljevi ovog istraživanja bi podrazumevali odgovore na sledeća pitanja:

1. *Da li postoji vertikalna socijalna diferencijacija, odnosno da li postoje razlike u društvenom statusu individua, kao i da li su bogatstvo i status nasledni?*

Genetičke analize pružaju mogućnost da se proverí srodstvo između bogatih ili siromašnih odraslih pojedinaca i dece. Kriterijume za izbor skeletnih ostataka definisao je O'Shea (1996). Studije drevne DNK ne mogu objasniti kada je i zašto nastala socijalna nejednakost, ali mogu odgovoriti na pitanje kako je nejednakost održavana, jer srodstvo može biti jedan od načina prenosa bogatstva kroz generacije (Fried 1967).

2. *Da li postoji horizontalna diferencijacija nekropole, odnosno društvena različitost prema polu, uzrastu i srodstvu?*

Na osnovu grobnih priloga, O'Shea (1996) je pretpostavio da se nekropola u Mokrinu može podeliti na severni i južni deo. Analizama srodstva, koje detektuju bliskost u istom segmentu nekropole, može se proveriti da li je ova velika nekropola podeljena na klanove koji su organizovani oko rodbinskih veza.

3. *Kakvo je bilo bračno prebivalište u Mokrinu?*

Bračno prebivalište i institucija braka važni su za analizu i interpretaciju društvene dinamike i srodničkih odnosa, jer upravo ovi procesi utiču na protok gena i varijabilnost između srodnih grupa (Ensor et al. 2017). Na osnovu podataka dobijenih iz analize uniparentalnih genetičkih markera može se pretpostaviti da li je društvo bilo organizovano kao matrijarhat ili patrijarhat, a u cilju rekonstrukcije socijalne strukture i transmisije statusa u društvu.

4. Da li postoje tragovi inbridinga u Mokrinskoj populaciji?

Procene genetičke varijabilnosti ove populacije mogu ukazati na koji način su ljudi stupali u bračne odnose i da li su rodbinske veze učestvovala u održavanju statusa u društvu.

5. Da li se genetička struktura populacije iz Mokrina razlikuje od genetičke strukture bronzanodopskih i savremenih populacija?

Pored praćenja promena u funerarnoj praksi i načinu života, studije drevne DNK omogućavaju međusobno poređenje populacija kroz osnovne populacione analize kako bi se bolje sagledale interakcije između drevnih populacija. Razumevanje tranzicije bakarnog ka bronzanom dobu uključuje i odgovor na pitanje da li se moriška kultura može posmatrati kao potomak bakarne kulture iz populacije koja je ranije živela na ovim prostorima, ili je Mokrinska populacija migrirala na ova područja. S obzirom da ovakve analize nisu do sada rađene na teritoriji današnje Srbije, nije poznato u kojoj meri su kulture stupale u međusobni kontakt i mešale se, zašto su slabile i nestajale, kao i koje kulture su se razvile nakon dolaska Jamne populacije.

6. Da li se u populaciji sa Mokrina mogu detektovati funkcionalni genetički markeri za depigmentaciju kože i toleranciju na mleko?

Na osnovu analiza funkcionalnih genetičkih markera mogu se proceniti njihove učestalosti u populaciji sa Mokrina, a potom i porediti sa drugim drevnim i savremenim populacijama sa ciljem razumevanja fenotipskih karakteristika “mokrinskih ljudi” i njihovog načina ishrane.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. SKELETNI MATERIJAL

3.1.1. Uzorkovanje materijala

Materijal sa arheološkog nalazišta Mokrin uzorkovan je u saradnji sa Nacionalnim muzejom u Kikindi. 24 petrozne kosti dobre očuvanosti izabrane su na osnovu prostorne distribucije grobova, specifičnog arheološkog konteksta i grobnih priloga na osnovu kriterijuma koji je postavio O'Shea (1996) (Slika 1.10.).

Postojanje vertikalne i horizontalne diferencijacija analizirano je kroz izbor skeletnih ostataka i grobnih artefakata sa severa nekropole – odraslih i mlađih siromašnih individua (257A, 257B, 260, 282, 295) (Tabela 3.1.) i odraslih i mlađih bogatih individua (161, 163, 181, 243, 287, 288, 302) (Tabela 3.2.). Isti princip korišćen je i za južni deo nekropole: odrasle i mlađe siromašne individue (186, 220, 223, 224, 225) (Tabela 3.3.) i odrasle i mlađe bogate individue (122S, 122E, 211, 228, 237, 246, 247) (Tabela 3.4.).

Tabela 3.1. Siromašne individue sa severnog dela nekropole u Mokrinu.

Laboratorijska oznaka	Grob	Pol	Starost	Grobni prilozi
Mok 10b	257 A	Ž	40-60	/
Mok 27	257 B	M	infant I	1. Bikonična čaša
Mok 28a	260	M	15-18	/
Mok 29a	282	M	15-20	1. Bikonična čaša 2. Bikonična posuda 3. Pehar sa detaljima
Mok 32	295	M	15-20	1. Cilindrična čaša 2. Bikonična posuda

Tabela 3.2. Bogate individue sa severnog dela nekropole u Mokrinu.

Laboratorijska oznaka	Grob	Pol	Starost	Grobni prilozi
Mok 14	161	Ž	9-11	1. Ogrlica napravljena od <i>Dentalium</i> školjki, kaolinskih perli, životinjskih kostiju i zuba 2. Bronzani ukras za glavu 3. Koštana igla 4. Bronzani prsten
Mok 15	163	M	45-55	1. Bikonična posuda 2. Kamena sekira 3. Bikonična čaša
Mok 16a	181	Ž	>18	1. Bikonična posuda 2. Ogrlica napravljena od <i>Dentalium</i> školjki, kaolinskih perli, zuba jelena i duguljaste bakarne ploče
Mok 24a	243	M	20-35	1. Bikonična posuda 2. Kamena sekira
Mok 30	287	Ž	20-35	1. Bronzani ukras za glavu 2. Bakarni dleto (moguće za trepanaciju), 3. Dve koštane igle 4. Bakarna narukvica 5. Ogrlica napravljena od <i>Columbela rustica</i> i <i>Dentalium</i> školjki, bakarnih i kaolinskih perli 6. Zlatni privezak, 7. Dve bikonične posude
Mok 31	288	Ž	60+	1. Dve bakarne narukvice 2. Ogrlica napravljena od <i>Dentalium</i> školjki i kaolinskih perli 3. Dve koštane igle 4. Bikonična posuda 5. Bikonična čaša
Mok 33	302	Ž	20-35	1. Konična posuda 2. Čaša 3. Bronzani ukras za glavu sa životinjskim zubima i kostima, kaolina, <i>Dentalium</i> perlama, <i>Columbella rustica</i> i <i>Cardium sp.</i>

Tabela 3.3. Siromašne individue sa južnog dela nekropole u Mokrinu.

Laboratorijska oznaka	Grob	Pol	Starost	Grobni prilozi
Mok 17a	186	Ž	8-11	1. Bikonična posuda 2. Bikonična čaša
Mok 19a	220	M	15-25	/
Mok 20	223	Ž	7-10	1. Bikonična posuda 2. Čaša
Mok 21a	224	Ž	25-40	/
Mok 22	225	M	25-35	/

Tabela 3.4. Bogate individue sa južnog dela nekropole u Mokrinu.

Laboratorijska oznaka	Grob	Pol	Starost	Grobni prilozi
Mok 9b	237	Ž	15-20	1. Bronzani ukras za glavu 2. Ogrlica napravljena od <i>Dentalium</i> školjki i kaolinskih perli 3. Bronzana narukvica 4. Bikonična posuda 5. Bikonična amfora
Mok 12	122E	M	6-9	1. Koštana igla 2. Ogrlica od kaolinskih i koštanih perli 3. Bronzana minduša
Mok 13	122S	Ž	35-50	1. Ogrlica od kaolina, životinjskih zuba, <i>Columbela rustica</i> i <i>Dentalium</i> školjki 2. Bronzana narukvica 3. Bronzani ukras za glavu
Mok 18a	211	M	50-55	1. Bronzani bodež 2. Veća posuda
Mok 23	228	Ž	35-50	1. Loptasti pehar 2. Pojasna niska (koštane perle, perle od <i>Dentalium</i> školjki i kaolina)
Mok 25a	246	Ž	45-50	1. Amfora 2. Poklopac 3. Ukras za glavu od bronzanih pločica i <i>Columbella</i> školjki 4. Ogrlica od bronzne, kaolina i <i>Dentalium</i> školjki 5. Unionidae školjka 6. Dve koštane igle
Mok 26a	247	Ž	10-12	1. Ogrlica od kaolina, životinjskih zuba i <i>Dentalium</i> školjki 2. Koštana igla 3. Vilica ovce

3.1.2. Fizičko antropološke analize na skeletima sa Mokrina

Fizičko antropološke analize na skeletima sa Mokrina sprovelo je nekoliko autora sa ciljem procene biološkog statusa odabranih individua (Farkas and Liptak 1971; Rega 1995; 2000; Stefanović 2008). Farkas i Liptak (1971) su procenili pol i starost koristeći kranijalne i postkranijalne kriterijume, nezavisno od orijentacije grobova, osim u slučaju mladih individua. Marija Krečković Gavrilović uradila je procenu starosti (Tabela 3.5.) i novije antropološke analize na 24 uzorkovane individue (Buikstra and Ubelaker 1994, rezultati objavljeni u Žegarac et al. 2021) (Tabela 3.5.), procenjujući visok tafonomski uticaj na skeletne ostatke, verovatno usled kiselosti zemljišta. Visinu je bilo moguće proceniti samo za polovinu uzoraka, s obzirom na fragmentaciju dugih kosti (Trotter 1970). Pet od 24 individua imalo je karijes, dok je linearna hipoplazija zubne gleđi (LEH)

prisutna kod 7 od 24 individue. *Cribra orbitalia*, porozna hiperostoza i periostitis, stanja koja su relativno česta u praistorijskim skeletnim ostacima, takođe su prisutna u uzorku. Kod individue u grobu 228 zapažena je auditorna egzostoza, a kod individue 246 došlo je do srastanja L3 i L4 pršljenova. Moguće je da je muškarac u grobu 225 imao zalečenu frakturu frontalne kosti (Žegarac et al. 2021).

Tabela 3.5. Fizičko antropološke analize na 24 skeleta sa Mokrina. Skraćenice: LEH - linearna hipoplazija zubne gleđi; C.orbitalia - *Cribra orbitalia*; P.hyperostosis – porozna hiperostoza.

Grob	Pol	Starost	Visina	Karijes	LEH	C. orbitalia	P. hiperostoza	Periostitis
122E	M	6-9	/	ne	ne	prisutna	odsutna	prisutan
122S	Ž	35-50	/	ne	da	N/A	N/A	odsutan
161	Ž	9-11	/	ne	ne	odsutna	odsutna	odsutan
163	M	45-55	164.67	ne	ne	odsutna	odsutna	odsutan
181	Ž	>18	/	N/A	N/A	odsutna	odsutna	odsutan
186	Ž	8-11	/	ne	ne	odsutna	prisutna	odsutan
211	M	50-55	/	ne	ne	odsutna	odsutna	prisutan
220	M	15-25	163.01	ne	ne	prisutna	odsutna	prisutan
223	Ž	7-10	/	ne	da	odsutna	odsutna	odsutan
224	Ž	25-40	143.4	da	ne	odsutna	odsutna	odsutan
225	M	25-35	165.77	ne	ne	odsutna	odsutna	odsutan
228	Ž	35-50	155.52	da	ne	prisutna	odsutna	odsutan
237	Ž	15-20	/	ne	da	odsutna	odsutna	prisutan
243	M	20-35	162.5	ne	ne	N/A	N/A	prisutan
246	Ž	45-50	154.84	da	ne	N/A	N/A	odsutan
247	Ž	10-12	/	ne	da	prisutna	prisutna	odsutan
257A	Ž	40-60	/	ne	ne	odsutna	odsutna	odsutan
257B	M	child	/	ne	ne	odsutna	odsutna	odsutan
260	M	15-18	/	ne	ne	N/A	odsutna	odsutan
282	M	15-20	/	da	da	N/A	N/A	prisutan
287	Ž	20-35	155.29	ne	ne	odsutna	odsutna	odsutan
288	Ž	60+	/	da	da	odsutna	prisutna	odsutan
295	M	15-20	/	ne	da	odsutna	odsutna	prisutan
302	Ž	20-35	/	ne	ne	odsutna	odsutna	odsutan

3.2. METODE

3.2.1. Produkcija paleogenoma

Eksperimentalni deo doktorske disertacije urađen je u specijalno prilagođenoj laboratoriji za istraživanja drevne DNK na Johannes Gutenberg univerzitetu u Majncu, u Nemačkoj (*Institute of Organismic and Molecular Evolution - iOME, Johannes Gutenberg University*). Finansije za analizu drevne DNK dobijene su kroz stipendiju “Wenner-Gren” fondacije (Gr. 9637) za projekat “*Kinship, Status and Social inequality in the Early Bronze Age of Southeastern Europe: the Case of Mokrin Necropolis*”. Svi koraci analiza urađeni su po protokolima za analizu drevne DNK i uključuju negativne kontrole kako bi se kontaminacija savremenom DNK sprečila i detektovala (Pääbo et al. 2004; Knapp et al. 2012; Llamas et al. 2017).

3.2.1.1. Priprema uzoraka za DNK izolovanje

Zbog destruktivne prirode analize drevne DNK, 24 petrozne kosti sa nekropole u Mokrinu su prvo fotografisane, deskriptivno opisane i evidentirane laboratorijskim brojem (Slika 3.1.), a potom i površinski sterilisane na UV svetlu (254 nm) 45 minuta sa svake strane. Za odstranjivanje površinske kontaminacije i čišćenje kostiju i njihovih kanala od zemlje i lepka (koji mogu redukovati efikasnost *Taq* polimeraze i na taj način inhibirati PCR reakciju), korišćen je fini i granulirani pesak pod pritiskom (*P-G 400, Harnisch & Rieth, Winterbach, Germany; Spezial-Edelkorund EW60/250 my i 30B/50 my; Harnisch+Rieth*). Nakon toga, disk bušilicom (*Electer Emax IH-300, MAFRA*) odvojen je najgušći deo petrozne kosti (deo kosti koji je svetliji i bez pora), koji je još jednom sterilisan UV zracima (254 nm) 45 minuta sa svake strane. U procesu pulverizacije (20 s na frekvenciji od 20/sec u bikerima; *MM200, Retsch*) dobija se prah najkompaktnijih delova petrozne kosti. Za jedno izolovanje DNK odvaja se 0,15 g, dok se ostali materijal skladišti u frižideru. Negativna kontrola tokom procesa pulverizacije umesto uzorka sadrži hidroksiapatit i tretirana je identično kao i uzorci u narednim koracima.

3.2.1.2. Izolovanje DNK

DNK je izolovana⁴² prateći protokol Yang *i saradnici* (1998) sa modifikacijama opisanim u MacHugh *i saradnici* (2000) i Gamba *i saradnici* (2014), kao i određenim promenama opisanim detaljno u Prilogu 1.



Slika 3.1. Petrozna kost iz groba 163.

U procesu izolacije DNK urađena je pre-liza (inkubacija uzoraka u puferu ili izbeljivaču) u cilju povećanja količine endogene DNK i odstranjivanja nečistoća (Der Sarkissian et al. 2014; Damgaard et al. 2015). Svakom uzorku (0.15 g skeletnog praha), dodat je 1 mL EDTA (0.5 M, pH8), nakon čega su uzorci inkubirani na sobnoj temperaturi 10 minuta, a potom je rastvor centrifugiran na maksimalnoj brzini (14,000 rpm) 5 minuta, a supernatant skladišten na temperaturi od 4°C. Nakon toga, 1 ml izolacionog pufera, koji sadrži EDTA (0.5 M, pH8), Tris-HCl (1 M, pH8), N-laurilsarkozin (5 %) i proteinazu K (14 – 22 mg/ml), dodat je svakom uzorku kako bi došlo do lize. Negativna kontrola

⁴² Prethodna metoda u upotrebi za izolovanje DNK koristila je fenol i hloroform i zasnivala se na razlici u polaritetu DNK i proteina pri čemu se DNK odvaja u vodenoj fazi, dok se proteini denaturišu u organskoj, tj. hidrofobnoj fazi (Hagelberg and Clegg 1991). Danas se najčešće koristi metod sa silika membranama u kome se DNK adsorbuje na silikonske čestice pod određenim uslovima (Rohland and Hofreiter 2007; Dabney et al. 2013). Upotrebom haotropskih soli raskidaju se vodonične veze između lanaca i izaziva odvajanje DNK od ostatka materijala (kostiju ili dentalnog matriksa) njenim vezivanjem za siliku. Ove soli takođe denaturišu proteine i smanjuju koizolaciju PCR inhibitora (Rohland and Hofreiter 2007; Dabney et al. 2013).

sadržala je samo izolacioni pufer, ne i uzorak. Reakcione tubice pokrivene su parafilmom, vorteksovane i inkubirane na 37°C, 24 sata u termošejkeru (900 rpm) kako bi se DNK oslobodila. Nakon završene inkubacije, uzorci su centrifugirani 10 minuta na 10,000 rpm kako bi ćelijski ostaci i proteini formirali talog, dok DNK lanci ostaju difuzno raspoređeni u supernatantu. Supernatant je pažljivo otklonjen i prebačen u nove 1.5 ml tube (izolat 1). Postupak sa izolacionim puferom je ponovljen i uzorci su još jednom inkubirani na 37°C i 24 sata (900 rpm), centrifugirani 10 minuta na 10,000 rpm, kako bi se dobio izolat 2. Poslednjeg dana izolacije izolati 1 i 2 svakog uzorka spojeni su na amikon filteru (*Amicon Ultra-4 30 kDA, 15 ml*)⁴³ i centrifugirani 10 minuta na 2500 rpm. DNK je potom isprana dva puta sa 3 ml 1X Tris-EDTA, a uzorci centrifugirani na 2500 rpm 20 minuta dok se rastvor nije koncentrovao prvo do 250 µl, a potom do 100 µl na amikon filterima. DNK je prečišćena od nukleotida, enzima i soli, sa specijalno dizajnimiranim *QIAGEN MinElute* kolonama sa silika membranom (*Qiagen, Hilden, Germany*) po protokolu proizvođača. Nakon dodavanja 500 µl vezujućeg pufera i 100 µl svakog uzorka iz amikon filtera svakoj koloni sa silika gel membranom (odnos 5:1 u korist vezujućeg pufera), dodato je 750 µl pufera za ispiranje koji sadrži etanol kako bi se uklonile sve preostale nečistoće sa membrane ostavljajući samo DNK vezanu za silika gel. Kolone su centrifugirane dva puta (1 minut na 13,000 rpm) kako bi se pufer dobro isprao. Zatim je dodato 44 µl elucionog pufera (10 mM Tris·Cl, pH 8.5 ili voda, T = 65°C) svakoj koloni, a nakon inkubacije 5 minuta na sobnoj temperaturi i centrifugiranja dolazi do oslobađanja visoko koncentrovane DNK sa silika membrane na dno epruvete.

3.2.1.3. Prirema biblioteke za skrining uzoraka

Biblioteke sa dvojnim indeks sekvencama pripremljene su za sekvenciranje na *Illumina MiSeq* platformi po protokolu Kircher i saradnici (2012) uz minimalne modifikacije. Izolati DNK se za potrebe skrininga ne tretiraju *USER* enzimom kako bi se specifični obrasci oštećenja DNK koristili za proveru njihove autentičnosti.

Negativne kontrole, kao i pozitivne kontrole koje predstavljaju oligonukleotide poznate koncentracije (engl. *nonsense hybrids*) procesuirane su u svakom koraku

⁴³ Amikon filteri imaju celulozne vertikalne membrane što omogućava veću površinu za filtraciju. Služe za koncentrovanje i prečišćavanje DNK - odnosno kao filteri na osnovu veličine čestica kroz koje prolazi veoma kratka DNK, proteinaza K i joni.

pripreme biblioteke i PCR reakciji da bi se detektovala potencijalna kontaminacija.

Proces pripreme biblioteke može se podeliti u nekoliko koraka:

1) Formiranje ravnih krajeva dvolančane DNK i fosforilacija 5' kraja

Prvi korak u pravljenju biblioteke na dvolančanoj DNK jeste formiranje ravnih krajeva DNK molekula (engl. *blunt end-repair*). Naime, fragmenti DNK molekula često imaju nejednake krajeve (engl. *overhangs*), pa se 3' jednolančani krajevi hidrolizuju, a 5' krajevi se prevode u dvolančanu DNK. Ova obrada DNK započinje se upotrebom dva enzima simultano (*NEBNext End Repair Module*): 1. T4 DNK polimerazom koja popunjava mesta gde ne postoji baza u 5'-3' smeru i na taj način formira ravni 5' kraj, a takođe poseduje i 3'-5' egzonukleaznu aktivnost čime se hidrolizuju jednolančani 3' krajevi; 2. T4 polinukleotidnom kinazom koja generiše 5'-fosforilisane krajeve, tj. dodaje fosfatnu grupu neophodnu za ligaciju adaptera na ravne krajeve dvolančane DNK (Briggs et al. 2007; Reich et al. 2010). Enzimi su funkcionalni uz prisustvo NEB pufera (10X, pH = 7.9; *New England Biolabs*) (Prilog 1). 20 µl uzorka, enzimi (3.5 µl), NEB pufer (7 µl) i 39.5 µl vode prvo je inkubirano 15 minuta na 25°C, a potom 5 minuta na 12°C. Za prečišćavanje uzoraka korišćene su *Qiagen MinElute* kolone po protokolu proizvođača.

2) Ligacija adaptera

Ligacija adaptera, koji sadrže P5 i P7 sekvence i omogućavaju da se DNK fragmenti vežu za protočnu ćeliju sekvenatora i amplifikuju, vrši se na oba kraja fragmenata DNK (Metzker 2010). Upotreba adaptera takođe je omogućila sekvenciranje kraćih fragmenata, kao i dobijanje informacije o krajevima molekula i oštećenjima DNK nakon smrti organizma, što je od izuzetnog značaja za studije drevne DNK (Knapp and Hofreiter 2010).

U ovom koraku, specifični enzim (T4 DNK ligaza) katalizuje formiranje fosfodiesterne veze između 5' fosfatne grupe i 3' OH grupe adaptera i fragmenata DNK. Odnos između adaptera i fragmenata ne bi trebalo biti viši od 10:1, jer previše adaptera može dovesti do formiranja njihovih dimera (Head et al. 2014).

1 µl adapter miksa (30 µM) dodato je prečišćenoj DNK uz vorteksovanje, a zatim i 19 µl master miksa koji je sadržao vodu (10 µl), enzim T4 DNK ligazu (5 U/µl; 1 µl; *ThermoFisher Scientific*), PEG-4000 (50 %; 4 µl) i T4 DNK ligaza pufer (10X; 4 µl). Rastvor je inkubiran 30 minuta na 22°C, nakon čega su uzorci ponovo prečišćeni *Qiagen MinElute* kolonama.

3) Popunjavanje jednolančanih praznina DNK

Ligacija adaptera može ostaviti mesta bez baza, a koja se popunjavaju enzimom Bst DNK polimerazom (engl. *fill-in step*). 20 µl master miksa, koji se sastoji od vode (13.5 µl), *ThermoPol* pufera (10X, 4 µl), dNTP-a (10 mM, 1 µl) i Bst polimeraze (8 U/µl, 1.5 µl; *New England Biolabs*), dodato je prečišćenoj i ligiranoj DNK. Rastvor je inkubiran 20 minuta na 37°C, a potom i 20 minuta na 80°C.

4) Dodavanje indeks sekvenci

Jedinstvene kombinacije indeks sekvenci, koje funkcionišu kao jedinstveni bar kodovi, omogućavaju paralelno sekvenciranje više uzoraka⁴⁴. Na ovaj način, znatno se smanjuje vreme analiza i cena značajno opada budući da se uzorci zajedno pripremaju za sekvenciranje u određenim koncentracijama (engl. *pooling*) (Gansauge and Meyer 2013; Kircher et al. 2012). Bar kodovi najčešće sadrže 8-10 baza i takođe omogućavaju da se razlikuje drevna od moderne DNK nakon pripreme biblioteke (Knapp and Hofreiter 2010).

Po 1 µl indeks sekvenci iz *NexteraXT index Kit v2 (Illumina)*, *Index-Primer P7* (5 µM), *Index-Primer P5* (5 µM), dodali su se obrađenim DNK fragmentima (3 µl), zajedno sa 20 µl *AccuPrime™ Pfx SuperMix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, United States)* (Prilog 1).

Pripremljene biblioteke su zatim umnožene PCR reakcijom u cilju detekcije drevne DNK, pod uslovima opisanim u tabeli 3.6. Dve PCR kontrole, koje umesto uzorka sadrže vodu, takođe su procesuirane. Nakon završenog PCR-a, PCR produkti su bili prečišćeni pomoću *MSB® Spin PCRapace* kolona (*Invitex, Stratec Molecular, Berlin, Germany*), dodavanjem 250 µl pufera za vezivanje i oslobađanjem DNK sa 11 µl pufera za eluciju (Prilog 1).

⁴⁴ Iako se mogu dodavati ili jedna (48 indeks i7 sekvenci od 6 bp) ili dve indeks sekvence u obe adapterske sekvence (na oba kraja DNK sekvenci) (24 indeks i7 sekvenci od 8 bp i 16 indeks i5 sekvenci takođe od 8 bp), preporučeno je koristiti jedinstvenu kombinaciju dva indeksa kako bi se sprečila pogrešna identifikacija uzoraka. Na ovaj način generiše se izuzetno veliki broj jedinstvenih biblioteka i smanjuje se verovatnoća greške, jer se identifikacija sekvenci proverava dva puta (Kircher et al. 2012).

Tabela 3.6. Temperaturni profil PCR-a za umnožavanje DNK biblioteka.

Korak	Temperatura [°C]	Vreme	
1. Inicijalna denaturacija	95	5 min	
2. Denaturacija	95	15 s	12 ciklusa
3. Dodavanje prajmera	60	30 s	
4. Elongacija	68	30 s	
5. Finalna elongacija	68	5 min	
	4	∞	

3.2.1.4. Kvantifikacija DNK i spajanje uzoraka

Merenje koncentracije biblioteka nakon njihovog umnožavanja urađeno je fluorometrijskom metodom na aparatu *Qubit® Fluorometric (dsDNA High Sensitivity assay, Invitrogen)* i analizom fragmenata na aparatu *Agilent 2100 Bioanalyzer System (High Sensitivity DNA, Agilent Technologies)* (Prilog 1).

Uzorci su spojeni u jednakoj koncentraciji dobijenih pomoću fluorometrijske metode (Tabela 3.7., Prilog 1). Pre sekvenciranja, spojene biblioteke su prečišćene pomoću pozitivno naelektrisanih magnetnih sfera (*Agencourt® AMPure® XP beads, Beckmann Coulter*) koje targetuju specifične DNK sekvence i vezuju se za njih na niskoj pH. Nasuprot tome, na visokoj pH postaju negativno naelektrisane pri čemu se DNK oslobađa. Magnetne sfere se koriste kako bi bili odstranjeni dimeri adaptera i prajmera, koji bi nepotrebno zauzimali mesto predviđeno za uzorak na protočnoj ćeliji i na taj način smanjili efektivnost i kapacitet sekvenciranja. Takođe, dimeri povećavaju broj sekvenci koje se ne poravnavaju na referentni genom i na taj način utiču na kvalitet podataka.

3.2.1.5. Skrining uzoraka

S obzirom na to da procenat endogene DNK veoma varira i zavisi od mnogobrojnih faktora, jedini pouzdani metod za proveru očuvanosti uzoraka je njihov skrining. Procena količine endogene DNK dobijena je površinskim sekvenciranjem na *MiSeq Illumina* platformi u *StarSEQ GmbH* laboratoriji (Majnc, Nemačka). Sekvenciranje je rađeno sa jednog kraja i dužinom sekvenci od 50 bp. Na osnovu ovih rezultata procenjuje se koji će uzorci biti sekvencirani na većoj dubini.

Tabela 3.7. Kvantifikacija i spajanje uzoraka za njihov skrining na *MiSeq Illumina* platformi. Uzorci Mok - uzorci sa nekropole Mokrin; MC - kontrola procesa pulverizacije; EK - kontrola izolovanja DNK; LK - kontrola biblioteke; NH - pozitivna kontrola; PK - PCR kontrola.

Biblioteka	Uzorak	USER enzim	Qubit (ng / μl)	μl za spajanje
LIB1_1_1	Mok 9B	-	13.3	1.80
LIB1_2_1	Mok 12	-	12.9	1.85
LIB1_3_1	Mok 13	-	12.4	1.93
LIB1_4_1	Mok 14	-	20.2	1.18
LIB1_5_1	Mok 15	-	18.5	1.29
LIB1_6_1	Mok 16A	-	0.76	31.45
LIB1_7_1	Mok 17A	-	18.4	1.30
LIB1_8_1	Mok 18A	-	17.5	1.37
LIB1_9_1	Mok 19A	-	21.8	1.10
LIB1_10_1	Mok 20	-	14.8	1.61
LIB1_11_1	Mok 21A	-	23.2	1.03
LIB1_12_1	Mok 22	-	20.6	1.16
LIB2_1_1	Mok 23	-	41.1	1.16
LIB2_2_1	Mok 24A	-	21.1	1.13
LIB2_3_1	Mok 25A	-	22.6	1.06
LIB2_4_1	Mok 26A	-	13.9	1.72
LIB2_5_1	Mok 27	-	22.3	1.07
LIB2_6_1	Mok 28A	-	16.7	1.43
LIB2_7_1	Mok 29A	-	15.9	1.50
LIB2_8_1	Mok 30	-	17.3	1.38
LIB2_9_1	Mok 31	-	10.9	2.19
LIB2_10_1	Mok 32	-	15.3	1.56
LIB2_11_1	Mok 33	-	23.2	1.03
LIB2_12_1	Mok 10B	-	17.7	1.35
SL28_7_1	MC_27-09-18	-	0.279	10.75
SL28_8_1	MC_28-09-18	-	0.87	3.45
SL28_9_1	MC_01-10-18	-	0.604	4.97
SL28_6_1	EK1	-	0.325	9.23
SL28_5_1	EK2	-	0.642	4.67
LIB1_13_1	NH	-	21.5	-
LIB1_14_1	LK1	-	0.217	13.82
LIB1_PK1	PK1	-	0.319	-
LIB1_PK2	PK2	-	0.356	-
LIB2_13_1	NH	-	28.5	-
LIB2_14_1	LK2	-	1.09	2.75
LIB2_PK1	PK1	-	1.74	-
LIB2_PK2	PK2	-	0.872	-

3.2.1.6. Sekvenciranje celih genoma

Dodatne biblioteke pripremljene su za dublje sekvenciranje (~1X) za sva 24 uzorka. Pre pripreme biblioteke, u 16.25 μ l DNK izolata dodato je 5 μ l *USER* enzima (1 U/ μ l). Enzim uracil DNK glikozilaza (UDG) otklanja uracil (U) i ostavlja abazno mesto za sobom koje se nakon toga uklanja delovanjem enzima endonukleaze VIII na oba lanca (Briggs et al. 2010; Rohland et al. 2015; Orlando et al. 2015). Rastvor je inkubiran 3 sata

na 37°C. Ovaj tretman obezbeđuje eliminaciju U baze usled čega dolazi do stvaranja nešto manjih fragmenata i nemogućnosti provere specifičnog obrasca za autentičnost uzoraka.

Nakon ovog koraka, priprema biblioteke za sekvenciranje nastavljena je kao u prethodno opisanim koracima (poglavlje 3.2.1.3.), sa dodavanjem novih jedinstvenih kombinacija indeks sekvenci (Prilog 1). Za amplifikaciju biblioteka takođe je korišćen enzim *AccuPrime™ Pfx SuperMix* (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, United States*), ali ovoga puta u 12 PCR paralela kako bi se povećala složenost biblioteke. Broj ciklusa na PCR-u sveden je na minimum na osnovu profila dobijenog fragment analizom (*Agilent 2100 Bionalyzer*) i iznosio je od 10 do 12 (Tabela 3.8.). Svako povećavanje broja ciklusa na PCR-u povećava količinu grešaka prilikom umnožavanja i dovodi do stvaranja većeg broja duplikata. Iako visok broj duplikata može biti eliminisan tokom bioinformatičkih analiza, on je nepoželjan jer smanjuje dubinu sekvenciranja zauzimajući mesto na protočnoj ćeliji i dovodi do smanjenja molekularne složenosti biblioteka, odnosno diverziteta sekvenci. Veća koncentracija endogene DNK zahteva manji broj ciklusa umnožavanja, što rezultuje u manjoj količini duplikata i boljim rezultatima. Sve paralele prečišćene su zajedno nakon amplifikacije, kvantifikovane i spojene u jednakim koncentracijama po protokolu opisanim u poglavlju 3.2.1.4.

Uzorci su sekvencirani na *Illumina's NovaSeq 6000* platformi na Institutu za genetiku Univerziteta u Bernu. Sekvenciranje je rađeno sa oba kraja (engl. *paired-end run*) i dužinom sekvenci od 50 bp. Nivo pouzdanosti podataka sekvenciranja zavisi od toga koliko je puta jedna pozicija na genomu pročitana, tj. broja različitih očitavanja koji potvrđuju da se tu nalazi određena baza (engl. *coverage*) (Kircher et al. 2012). Teorijski proračun za dobijanje dubine sekvenciranja (C) od 1X, što je dovoljno za procenu srodstva među individuama, kao i osnovne populacione analize, računat je po *Lander/Waterman* jednačini: $C = \frac{L \times N}{G}$ (Lander and Waterman 1988), gde je L - dužina očitavanja (65 u slučaju 2X50 sekvenciranja), N - broj očitavanja i G - dužina genoma koja za referentni genom *hg19* iznosi 2,858,674,665 baza. Stopa duplikata je pretpostavljena empirijski i iznosi 20%.

Tabela 3.8. Kvantifikacija i spajanje uzoraka za sekvenciranje na *NovaSeq Illumina 6000* platformi. Uzorci Mok - uzorci sa nekropole Mokrin; LK - kontrola biblioteke; NH - pozitivna kontrola; PK - PCR kontrola.

Biblioteka	Uzorak	USER enzim	Broj PCR ciklusa	Qubit ($\mu\text{g} / \mu\text{l}$)	μl za spajanje
Lib 3 1-1	Mok 9B	da	10	27.12	5.74
Lib 3 2-1	Mok 12	da	10	23.8	9.47
Lib 3 3-1	Mok 13	da	10	23.1	6.86
Lib 3 4-1	Mok 14	da	10	18.9	8.51
Lib 3 5-1	Mok 15	da	10	24.7	7.16
Lib 3 6-1	Mok 16A	da	12	42.2	3.22
Lib 3 7-1	Mok 17A	da	10	49.6	3.03
Lib 3 8-1	Mok 18A	da	10	47.1	20.40
Lib 3 9-1	Mok 9A	da	10	55	2.19
Lib 3 10-1	Mok 20	da	10	44.7	3.78
Lib 3 11-1	Mok 21A	da	10	59.2	7.84
Lib 3 12-1	Mok 22	da	10	32.3	4.11
Lib 3 13-1	Mok 23	da	10	42.1	2.84
Lib 3 14-1	Mok 24A	da	10	47	2.60
Lib 4 1-1	Mok 25A	da	10	34.9	3.52
Lib 4 2-1	Mok 26A	da	10	38.6	3.05
Lib 4 3-1	Mok 27	da	10	41.6	4.47
Lib 4 4-1	Mok 28A	da	10	29.6	4.22
Lib 4 5-1	Mok 29A	da	10	28.1	4.13
Lib 4 6-1	Mok 30	da	10	36	3.33
Lib 4 7-1	Mok 31	da	10	40.3	3.63
Lib 4 8-1	Mok 32	da	10	42.1	3.23
Lib 4 9-1	Mok 33	da	10	27.1	5.49
Lib 4 10-1	Mok 10B	da	10	46.9	2.53
Lib 3 15-1	NH	da	12	21.5	/
Lib 3 16-1	LK1	da	12	0.217	/
Lib 4 11-1	NH	da	12	28.5	/
Lib 4 12-1	LK2	da	12	1.09	/
PK1_13.11	PK1	/	12	0.4	/
PK2_13.11	PK2	/	12	0.87	/
PK1_15.11	PK1	/	12	0.61	/
PK2_15.11	PK2	/	12	0.46	/

3.2.2. Bioinformatičke analize

Bioinformatičke analize rađene su u *Unix* operativnom sistemu po protokolu opisanim u Sell (2017), specijalno prilagođenom za obradu podataka dobijenih sekvenciranjem drevne DNK (Slika 3.2.).

3.2.2.1. Obrada podataka

Podaci sekvenciranja dobijaju se u tekstualnom fasta formatu (*.fa* ili *.fastq*) koji prikazuje redosled nukleotida u DNK. Svakoj bazi dodeljen je određen broj koji predstavlja meru kvaliteta (engl. *base quality score* - *Q*) i verovatnoću da je baza na

određenoj poziciji tačno očitana. Visoka vrednost kvaliteta predstavlja malu verovatnoću da je došlo do greške prilikom očitavanja baza (Sell 2017). Potrebno je da baze imaju minimalnu vrednost 15 kako bi bile dobrog kvaliteta. Mogućnost detektovanja razlike između retkih bioloških varijanti i grešaka prilikom sekvenciranja ujedno je jedan od najvećih problema ove tehnologije. Ovaj problem se rešava povećavanjem pokrivenosti sekvenciranja jer se određena promena detektuje na više očitavanja.

Nakon razdvajanja *.fastq* fajlova na osnovu svojih specifičnih indeks sekvenci (demultipleksiranje), uklonjeni su artefakti poput dimera adaptera i himernih sekvenci pomoću programa *TagDust*. Ovaj program zahteva *.fastq* ulazne fajlove i poredi originalne adapter i prajmer oligonukleotidne sekvence sa izlaznim fajlovima (Kircher 2012).

Sekvence koje sadrže kratke DNK od interesa često na svojim krajevima sadrže i delove adaptera ukoliko dužina očitane sekvence prevazilazi DNK molekul koji je sekvenciran. Ove ostatke sekvenci adaptera na krajevima DNK sekvenci od interesa potrebno je identifikovati i “trimovati”, tj. ukloniti kako ne bi uticale na mapiranje sekvenci i dalje analize. “Trimovanje” je urađeno prema protokolu Kircher (2012) uz pomoć softvera *trimomatic 0* (Bolger et al. 2014) koji preklapa sekvence adaptera sa svakom sekvencom, počevši od poslednje baze sekvence i prve baze adaptera. Kriterijum za njihovo uklanjanje je identičnost od najmanje 90%. Potom sve sekvence prolaze proveru kvaliteta svake baze u svakoj sekvenci, kako loše očitane baze ne bi uticale na dalje analize. Sekvence koje sadrže više od 5% baza koje ne dostižu prag kvaliteta od 15, uklonjene su iz analiza (Kircher 2012).

S obzirom da je sekvenciranje rađeno sa oba kraja, “*forward*” i “*reverse*” sekvence su spojene u jednu sekvencu koristeći *BBMerge* program koji zahteva minimalno preklapanje od 3 bp (Bushnell et al. 2017). Sekvenciranje sa oba kraja za kratke sekvence svodi grešku na minimum jer se povećava kvalitet mapiranja usled dobijanja veće dužine sekvenci (oko 65 bp) i većeg kvaliteta baza. Prilikom provere kvaliteta, određene sekvence gube svog para (engl. *orphans*), te su one odstranjene iz daljih analiza.

Jedan od izazova prilikom ovih analiza je upravo proces preklapanja krajeva kratkih DNK sekvenci u duže (engl. *contigs*), njihovo grupisanje u formaciju “skele” (engl. *scaffolds*) i poravnanje na referentni genom radi dobijanja celog genoma.

Poravnanje na referentni genom (engl. *alignment*) zahteva upotrebu složenih algoritama, a softveri najčešće dozvoljavaju određene praznine i određeno nepreklapanje između sekvenci i referentnog genoma zbog grešaka prilikom sekvenciranja ili ponovljenih nizova u genomu. U slučaju nedoumica prilikom mapiranja sekvenci, softver koristi probabilistički model poput procene najveće verovatnoće (engl. *maximum likelihood method*) i na taj način određuje najverovatnije poreklo sekvence. Sekvence su poravnate na humani referentni genom *hg19* (*GRCh37*, dostupan u databazi nacionalnog centra za biotehnoške informacije - *NCBI*) softverom *Bwa aln* (*Burrows Wheeler Transformation*), podešenog na preporučene parametre za procenat identičnosti, tolerisanje praznina i dozvoljenih nepodudarnosti (Li and Durbin 2009). Nakon konvertovanja *fastq* formata u *.sai*, tekstualni SAM format (-- *bwa samse* komanda), softver *Samtools* je korišćen za konvertovanje SAM fajlova u izlazni fajl mapiranja - binarni BAM format (engl. *Binary Alignment Map*) koji je efikasniji za skladištenje podataka. Kvalitet poravnavanja procenjen je i prilikom ovog koraka, pri čemu su odstranjene sve sekvence koje su ili nepravilno ili nisu mapirane na referentni genom.

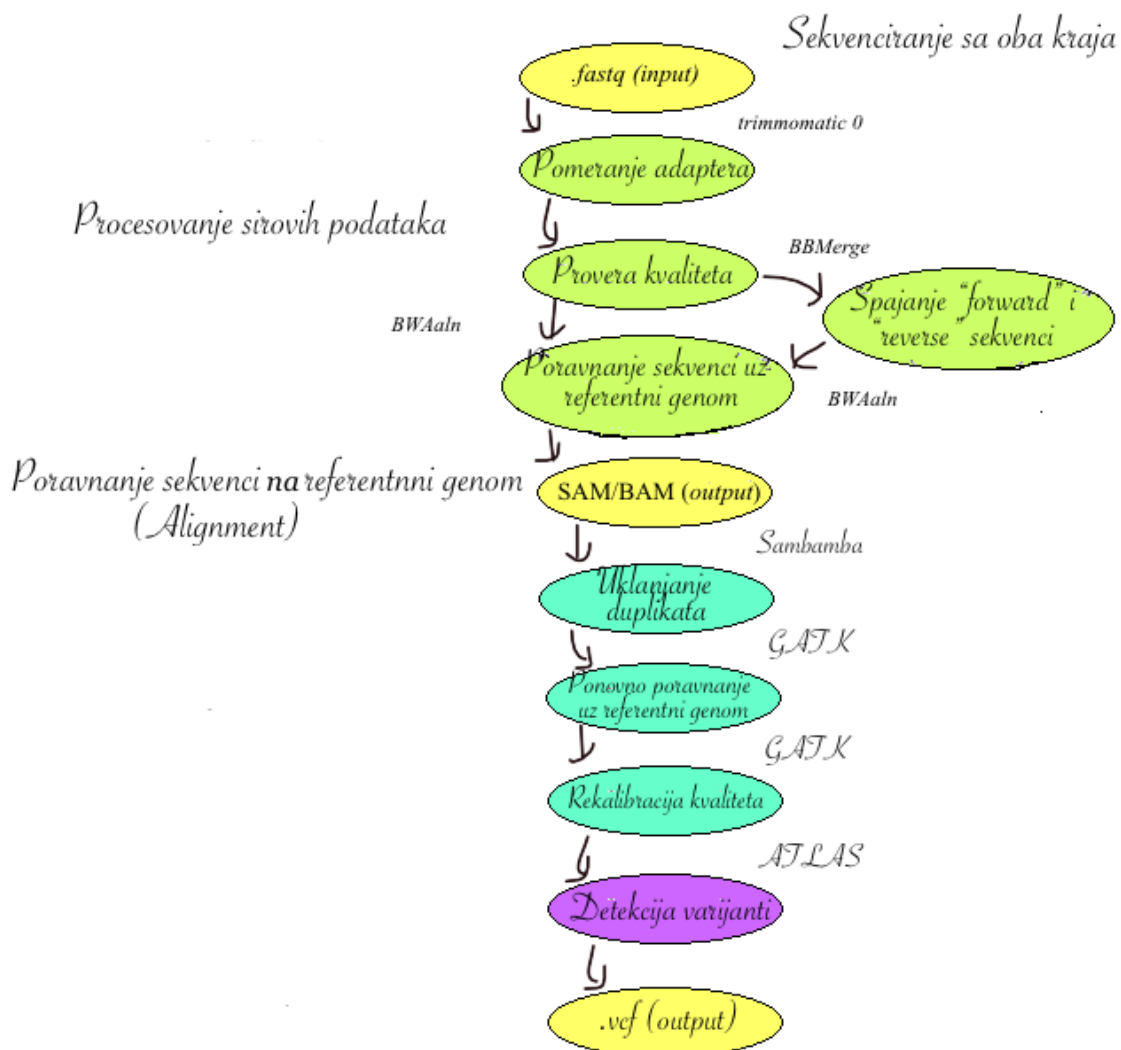
Duplikati su proizvodi umnožavanja prilikom PCR reakcije koji dovode do prezastupljenosti određenih sekvenci. Prilikom poravnanja, duplikati su detektovani i odstranjeni softverom *sambamba* (Tarasov et al. 2015) kako ne bi došlo do stvaranja pogrešnog konsenzusa (reprezentativne sekvence sa najvećom sumom mere kvaliteta) ili pogrešne procene sekvenci na polimorfnim mestima u genomu. Stopa duplikata (razlika između svih sekvenci koje su poravnate na referentni genom i jedinstvenih sekvenci) je informativna, jer visoka stopa duplikacije sugerise nisku složenost biblioteke (mali broj različitih molekula u biblioteci) i loše očuvan uzorak.

U prvom lokalnom poravnanju, *bwa aln* softver dozvoljava određena nepreklapanja pri čemu može doći do greške u identifikaciji insercija i delecija (indela). Sekvence su nakon odstranjivanja duplikata ponovo lokalno poravnavate *GATK* softverom (*The Genome Analysis Toolkit*) i svaka pozicija oko poznatih nukleotidnih polimorfizama i indela je proverena radi poboljšanja kvaliteta informacije i dobijanja optimalnog poravnanja i sekvence sa najvećim kvalitetom (McKenna et al. 2010). Iako prvenstveno dizajniran za otkrivanje varijanti i genotipova, *GATK* se koristi i za rekalibraciju kvaliteta baza i sekvenci (*GATK Base Recalibrator - BQSR*). Sekvence su dalje filtrirane za minimalnu dužinu od 30 bp.

Detekcija pojedinačnih nukleotidnih polimorfizama (engl. *SNP calling*) urađena je koristeći *ATLAS* paket metodom najveće verovatnoće (Hoffmanová et al. 2016; Link et al. 2017, *ATLAS* paket je koristio Jens Blöcher u saradnji sa Univerzitetom u Majncu) kako bi se dobila informacija o genotipu, a potom i procena o učestalosti alela i heterozigotnosti. Efikasnost procesa raste sa dubinom sekvenciranja i većom složenošću biblioteka. *ATLAS* procenjuje i greške sekvenciranja i promene na DNK nakon smrti organizama, što predstavlja veliku prednost kod uzoraka sa niskom dubinom sekvenciranja, jer se ove promene moraju uzeti u obzir prilikom detekcije varijanti i procene genetičkog diverziteta. Koristeći rekalibrisane *.bam* fajlove za ulaz, za svaki lokus nezavisno je izračunata verovatnoća svakog genotipa, a potom je diploidni genotip sa najvećom verovatnoćom određen za dati lokus (*maximum likelihood estimate - MLE*) (Hoffmanová et al. 2016), kao i verovatnoća da je određena baza prisutna na svakoj poziciji (engl. *allele presence call*) radi detekcije 124,000 pojedinačnih nukleotidnih polimorfizama (Mathieson et al. 2015) među kojima su i polimorfizmi na Y hromozomu i mtDNK. Izlazni fajl je u *.vcf* formatu (engl. *variant call format*) u kome su varijante prikazane za svaku poziciju u genomu.

Iako je moguće proceniti diploidne genome, detekcija varijanti je često ograničena na haplotipove, pri čemu se nasumično odabira jedan od prisutnih alela na svakoj poziciji ili alel koji je najčešći na toj poziciji. Iako je ovom metodom samo polovina alela procenjena, ovo je prednost kada se radi o genomima sa niskom dubinom sekvenciranja (Hoffmanová et al. 2016). Kako bi se haploidni genom uporedio sa diploidnim referentnim genomom, on se mora duplirati, pri čemu se dobija pseudodiploidni genotip. Za razliku od većine programa, *ATLAS* ne procenjuje alel na osnovu najčešće baze na određenoj poziciji, već ocenjuje kvalitet svakog alela baziranog na verovatnoći, dok se na osnovu individualnih genotipova procenjuje učestalost alela u populaciji (*doBayesian* opcija) (Link et al. 2017).

Pomoću softvera *samtools* (opcija *bedcov*), koji računa prosečan broj alela na svakom alelu u referentnom genomu i broj alela koji su pokriveni barem jednom, dobija se dubina sekvenciranja.



Slika 3.2. Šematski prikaz obrade podataka.

3.2.2.2. Provera autentičnosti rezultata

Razvoj tehnologije omogućio je lakšu detekciju kontaminacije i proveru autentičnosti uzoraka bioinformatičkim metodama koje se baziraju na poređenju sekvenci na nukleotidnim pozicijama koje su dobro karakterisane u savremenoj DNK (Green et al. 2010; Ginolhac et al. 2011; Jónsson et al. 2013; Skoglund et al. 2014; Korneliussen et al. 2014; Renaud et al. 2015; Peltzer et al. 2016). U studijama skeletnih ostataka sa Mokrina svaka sekvenca prošla je sledeće kontrole kvaliteta kako bi se potvrdila autentičnost rezultata:

1. Proveru dužine sekvence.
2. Visoku učestalost tranzicija C u T usled deaminacije citozina na jednolančanim dužim

krajevima, i njima komplementarnim zamenama G u A (Briggs et al. 2007; Sawyer et al. 2012) programom *MapDamage 2.0*. Ovaj program koristi SAM fajl kao input (*samtools*), a grafički prikaz se radi u R-u (Ginolhac et al. 2011; Jónsson et al. 2013). Drevni uzorci, koji nisu tretirani *UDG*-om, pokazuju višu učestalost tranzicija C u T na 5' krajevima poravnatih sekvenci, dok drevni uzorci tretirani enzimom koji popravlja ova oštećenja ne pokazuju tipičan obrazac promena. Nedostatak ovog programa je nepostojanje jasne razgraničenosti između očekivanih obrazaca kod drevne i moderne DNK. Ove promene nakon smrti organizama procenjene su i tokom detekcije varijanti *ATLAS* softverom (Link et al. 2017).

3. Programom *Contamix* (Fu et al. 2013) koji se koristi za detekciju kontaminacije. Dobijene mtDNK sekvence se porede sa određenim pozicijama na mtDNK iz databaze koja sadrži 311 referentnih genoma mtDNK savremenih ljudi iz različitih populacija, a koji bi predstavljali kontaminaciju (Green et al. 2009). Sekvence su klasifikovane kao autentične ukoliko ne postoji sličnost sa modernom mtDNK, pri čemu se mora proceniti više od 95% sekvenci kako bi rezultat bio pouzdan (Green et al. 2009).

3.2.2.3. Određivanje pola

Pol je veoma važan u određivanju uloge i ponašanja individua tokom života, kao i za njihovu reprodukciju, a samim tim i za dobijanje informacija o populacionoj strukturi, o migracijama u kojima je jedan pol potencijalno dominantan, kao i o bračnom prebivalištu.

Dobijene sekvence sa Mokrina korišćene su za određivanje biološkog pola po metodi Skoglund *i saradnici* (2013). Pouzdanost ove metode je visoka, ali je neophodno da sekvence budu duže od 30 bp i da se sekvenciranjem dobije minimum od 100,000 sekvenci mapiranih na svim hromozomima ili 3,000 sekvenci mapiranih na polnim hromozomima. Sekvence se mapiraju na humani X i Y hromozom, pri čemu se dobija R_y koji predstavlja odnos broja Y sekvenci koje su mapirane u odnosu na ukupan broj sekvenci na polnim hromozomima. U slučaju groba 211, prethodno opisan metod nije dao pouzdani rezultat, te je korišćen metod Cassidy *i saradnici* (2020), zasnovan na izračunavanju R_x , koji predstavlja odnos sekvenci na X hromozomu i svih autozomnih sekvenci. Ovaj metod je efikasan i prilikom dobijanja manjeg broja sekvenci.

3.2.2.4. Uniparentalni Markeri

Za predviđanje mitohondrijske haplogrupe (Hg) korišćen je *.vcf* fajl i program *Haplogrep2.0* (<https://haplogrep.i-med.ac.at/app/index.html>) (Weissensteiner et al. 2016). Za poravnanje mtDNK korišćen je referentni genom rCRS (engl. *revised Cambridge Reference Sequence*).

Analize markera na Y hromozomu pružaju informaciju o nasleđivanju po očevoj liniji, te mogu biti informativni o kretanjima i ponašanju muškaraca. Postoje mnogi izazovi prilikom određivanja haplogrupa Y hromozoma, a pre svega su to visoko ponovljeni delovi hromozoma i vezanost udaljenih genetičkih markera (Kivisild 2017), pa je potrebno pažljivo odabrati program s obzirom da postoje varijacije u predviđanju. Y haplotip određen je pomoću programa *yhaplo* (Poznik et al. 2016), koji je tolerantan prema nedostajućim podacima i greškama, te je i koristan kod uzoraka sa malom dubinom sekvenciranja. Program koristi *.vcf* format koji je transformisan u *plink* format, a potom i u specifičan *yhaplo* input format (Poznik et al. 2016). Nomenklatura je bazirana na *isogg tree* (*International Society of Genetic Genealogy*, *isogg.2016.01.04.txt*), koji se pokazao najoptimalnijim za analizu diverziteta Y hromozoma ukoliko su uzorci iz Evrope (Kivisild 2017).

Na osnovu dobijenih rezultata, utvrđen je ukupan broj haplotipova u uzorku (k) i izračunat njihov diverzitet \hat{h} :

$\hat{h} = \frac{n}{(n-1)} \times (1 - \sum_{i=1}^k x_i^2)$, gde je k = broj haplotipova, x_i = učestalost određenog haplotipa, a n = broj individua.

3.2.3. Analize srodstva

Kako bi se procenile verovatnoće da su aleli dve individue identični po poreklu, mora se sagledati: 1. broj deljenih varijanti na lokusu pri čemu se dobijaju vrednosti za Kotermanove koeficijente (k_0 , k_1 i k_2) i stepen srodstva između dve individue (Weir et al. 2006); 2. učestalost ovih varijanti u populaciji. Aleli koji su ređi (odnosno imaju nisku učestalost u populaciji) su informativniji u studijama srodstva, jer deljenje retkih alela predstavlja jak pokazatelj da su aleli identični po poreklu (Vai et al. 2020). Nažalost, učestalosti alela na svakom lokusu nisu uvek poznate za drevne populacije, te se za analize koriste programi sa različitim pristupom ovom problemu (Prilog 2) (Keyser-

Tracqui et al. 2003; Anderson and Weir 2007; Lipatov et al. 2015; Korneliussen and Moltke 2015; Sikora et al. 2017; Kuhn et al. 2018).

3.2.3.1. Analiza srodstva pomoću *lcMLkin* programa

Analiza srodstva urađena je pomoću C++ softvera *lcMLkin* (Lipatov et al. 2015) koji je specijalno prilagođen radu sa drevnim uzorcima. Od *.bam* fajlova se generišu genotipovi sa najboljim kvalitetom i procenjuje se verovatnoća da su diploidni genomi identični po poreklu, kao i njihov koeficijent srodstva. Mala dubina sekvenciranja (kao u slučaju uzoraka sa Mokrina) dovodi do smanjenja pouzdanosti prilikom posmatranja manjeg broja markera, kao i do procenjivanja manjeg broja heterozigota. Iz tog razloga, analize su bile ograničene na 467,179 pojedinačnih nukleotidnih polimorfizama kako bi svih 24 individua rezultovalo u ~200,000 alela koji se mogu koristiti za njihovo poređenje i pouzdano određivanje odnosa između individua. *lcMLkin* sofver takođe pretpostavlja da su pojedinačni nukleotidni polimorfizmi nezavisni, što se postiže programom *PLINK 2* (Chang et al. 2015) i komande `--indep-pairwise 50 5 0.2`.

Ovaj softver nije efikasan u dve situacije: ukoliko individue za koje se srodstvo proverava vode poreklo iz više populacija, što može voditi ka lažno pozitivnim rezultatima, ili ukoliko je došlo do inbridinga. Kako bi se odstranile ove poteškoće, dodatne ekstenzije i parametri su postali sastavni deo softvera, ali je ipak ove analize uvek potrebno proveriti još jednim programom.

3.2.3.2. Analiza srodstva pomoću programa *READ* (engl. *Relationship Estimation from Ancient DNA*)

Rezultati dobijeni sa *lcMLkin* sofverom provereni su programom *READ* (Kuhn et al. 2018) koji predstavlja heuristički metod za detektovanje mogućih srodnih individua. Takođe je specijalno dizajniran za drevne podatke sekvencirane na maloj dubini, ali se oslanja na pseudohaploidne genotipove (po jedan nasumično izabran alel po individui i lokusu) s obzirom da genomi sekvencirani na maloj dubini obično ne vode ka dobijanju heterozigotnih genotipova. Input za *READ* program su *.tped* / *.tfam* fajlovi koji sadrže pseudohaploidne genotipove sa Mokrina i 99 nesrodnih referentnih individua iz savremene centralne evropske populacije (CEU).

Za razliku od *lcMLkin* sofvera, *READ* ne zavisi od procena učestalosti alela u

populaciji i zasniva se na normalizaciji podataka pod pretpostavkom da individue nisu srodne kako bi analiza bila nezavisna od genetičkog diverziteta populacije.

READ daje nizak nivo lažno pozitivnih rezultata, ali usled malog broja pojedinačnih nukleotidnih polimorfizama može doći do lažno negativnih rezultata za detektovanje veza drugog stepena.

3.2.4. Populacione analize uzoraka sa Mokrina

Da bi genetički markeri bili informativni u populacionim analizama, oni moraju biti polimorfni. Na uzorcima sa Mokrina, urađena je analiza glavnih komponenti (engl. *principal component analysis - PCA*), analiza porekla i *f* statistika. Za vizuelizaciju je korišćen R. Ove osnovne populacione analize trebalo bi uraditi zajedno sa analizama srodstva kako bi se utvrdilo da li su populacije od interesa genetički strukturirane i da li postoji genetička sličnost između ove populacije sa drugim modernim i drevnim populacijama.

3.2.4.1. Analiza glavnih komponenti

PCA predstavlja metodu u kojoj se multidimenzionalni podaci, koji potiču od individua i ogromnog broja pojedinačnih nukleotidnih polimorfizama, redukuju na dobijanje informacije o odnosima između individua u dve dimenzije (Novembre and Stephens 2008). Na taj način se rezultat može vizuelno predstaviti, pri čemu dolazi do minimalnog gubitka varijabilnosti podataka. Glavne komponente *PC1* i *PC2* (engl. *principal components - PC*) sadrže najveći deo varijabilnosti i na grafiku su predstavljene jedna naspram druge.

PCA analiza urađena je radi dobijanja informacija o genetičkoj sličnosti ili različitosti populacije sahranjene na Mokrinu sa populacijama savremenih Evropljana koje su korišćene kao referentni panel (Lazaridis et al. 2016). Analiza je urađena u programu *LASER 2.04* (Wang et al. 2015). U prvom koraku analize formira se referentni panel na osnovu genotipova modernih individua⁴⁵: južnoevropljana (sa severa i juga Italije, Sicilije i Sardinije, Kipra, iz Grčke, Španije i Baskije), iz centralne i istočne Evrope (Bugarske, Rumunije, Mađarske, Nemačke, Francuske, Hrvatske), slovenskih populacija

⁴⁵ Ne-evropske populacije, kao i određene populacije iz Evrope su uklonjene iz referentnog panela kako bi plot bio jasniji.

(Rusije, Ukrajne, Belorusije, Poljske i Mordovije), sa Baltika (Litvanije), Britanskih ostrva (Engleske, Škotske, Irske, Velsa) i Norveške. Potom su ulazni podaci uzoraka (.bam fajlovi) projektovani na referentni panel koristeći analizu prokrusta implementiranu u *LASER* i baziranu na 10 ponavljanja (analiza prokrusta dozvoljava da se uzorak projektuje na referentni prostor).

Prednost *PCA* metode ogleda se u tome što ne zahteva generisanje genotipova i što se može uraditi na relativno malom broju pojedinačnih nukleotidnih polimorfizama, te se uspešno može koristiti i na podacima koji nisu duboko sekvencirani. Međutim, kao i u svim analizama, projekcija je verodostojnija sa većom dubinom sekvenciranja jer obuhvata i veći broj pojedinačnih nukleotidnih polimorfizama.

3.2.4.2. Analize porekla populacije u Mokrinu

ADMIXTURE je program koji se koristi za procenjivanje proporcija predačkih komponenti uzoraka na osnovu velikog broja neutralnih lokusa, dok je program *PLINK* korišćen za konvertovanje .vcf fajlova (Patterson et al. 2012). Iz referentnog seta pojedinačnih nukleotidnih polimorfizama HOIII (Haak et al. 2015), programom *PLINK* su uklonjeni markeri koji nisu determinisani ni u jednom uzorku, kao i oni koji pokazuju genetičku neravnotežu.

Analize porekla rađene su pomoću -- unsupervised opcije koja ne zahteva precizno definisanje pripadnosti individua određenim populacijama, te su korisne pre upotrebe drugih metoda gde populacije i njihovo poreklo moraju biti poznati. S obzirom da broj klastera, odnosno broj predačkih populacija, može varirati, na osnovu saznanja iz prethodnih populacionih studija (Lazaridis et al. 2014; 2016; Allentoft et al 2015, Hoffmanová et al. 2016; Mathieson et al. 2018) uzorci iz bronzanog doba modelovani su sa tri komponente ($K=3$). Populacije su predstavljali zapadni lovci sakupljači (*Loschbour_snpAD.DG*, *LaBrana1_published.SG*, *I1507*, *Bichon.SG*, *Villabruna*), neolitske zemljoradničko-stočarske zajednice (*I1581*, *I1583*, *I1580*, *I1585*, *I1579*, *I1099*, *I1103*, *I1101*, *I1097*, *I0744*, *I1096*, *I1098*, *I0708*, *I0745*, *I0746*, *I0707*, *I0709*, *I0736*, *I0723*, *Bon002.SG*, *Tep003.SG*, *Bar31.SG*, *Bar8.SG*) i populacije iz stepa istočne Evrope (*I0231*, *I0370*, *I0444*, *I0357*, *I0429*, *I0438*, *I0443*, *RISE547.SG*, *RISE548.SG*, *RISE550.SG*, *RISE552.SG*). Savremeni i drevni referentni genomi dostupni su na internet stranici laboratorije Dejvida Rajha (Mallick et al. 2016;

<https://reich.hms.harvard.edu/downloadable-genotypes-present-day-and-ancient-dna-data-compiled-published-papers>; 2019). Budući da se Mokrin nalazi na teritoriji današnje Srbije, za referentne genome uzete su populacije lovaca sakupljača sa Đerdapa, neolitskih zemljoradničko-stočarske zajednice iz Egeje i Jamne kulture kako bi se procenilo da li individue sa Mokrina vode poreklo od više populacija.

Za izračunavanje proporcija porekla populacije korišćen je statistički program *qpAdm* implementiran u *Admixtools*, koji pretpostavlja da je došlo do mešanja između dve ili više populacija i omogućava procenu protoka gena (Haak et al. 2015). *qpAdm* se bazira na *f*-statistici i pokazuje da li se populacija od interesa može modelovati kao potomačka populacija jedne ili više predačkih populacija, te ovaj metod zahteva definisanje target i izvornih populacija (referentne populacije), kao i genetički veoma udaljenih populacija (Patterson et al. 2012). Za *qpAdm* analizu korišćen je set dalekih populacija: Han, Karitiana, Mbuti, Onge, Papuan, Mota, Ust'-Ishim, MA1, El Mirón, GoyetQ116-1. *qpAdm* standardne greške računata su opcijom - *jackknifing* isključujući sukcesivne blokove od 5cM.

Dodatno, individue sa Mokrina analizirane su zajedno pri čemu je po jedna individua iz para srodnika (individua za koju su analize rezultovale u manjem broju nukleotidnih polimorfizama) morala biti isključena iz analiza, te su korišćene sledeće individue: 237, 257A, 122E, 122S, 163, 186, 220, 223, 224, 246, 247, 260, 282, 287, 295, 302.

3.2.4.3. *f*-statistika

f-statistika posmatra korelacije u učestalosti alela među dve, tri ili četiri populacije kako bi se dobila informacija o stepenu zajedničke evolucione istorije populacija (Patterson et al. 2012; Lipson et al. 2013; Lipson 2020).

Kako bi se izračunala genetička sličnost populacije sa Mokrina sa drugim populacijama, korišćena je *outgroup f₃* statistika. Ona predstavlja poseban slučaj *f₃* statistike, opisan kao $F_3(C:A,B)$ ili $F_3(outgroup:test,uzorak)$, u kojoj se referentne populacije (A ili test) i uzorci od interesa (B) upoređuju u odnosu na veoma daleke predačke populacije (označene kao C ili *outgroup* populacije), tj. populacije koje nisu u bliskoj relaciji sa drugim populacijama, a za koje se najčešće uzimaju afričke *Komani*, *Mbuti* ili *Yoruba* populacija. Prednost ispitivanja veoma udaljene populacije ogleda se u

tome što pokazuje isti odnos učestalosti alela u odnosu na sve druge populacije (Patterson et al. 2012), a svaka sledeća promena u učestalosti alela, usled delovanja genetičkog drifta, ne utiče na odnos između populacija A i B. Menjanje populacija A (ili test) za koje se sumnja da postoji genetička sličnost sa uzorcima od interesa (B), ogleda se u promenama vrednosti f_3 statistike, a biće proporcionalna efektima genetičkog drifta od vremena kada su se dve populacije razdvojile. Više vrednosti f_3 statistike ukazuju na veću genetičku sličnost među uzorcima.

Za analize je korišćen program *Admixtools* koji predstavlja kolekciju statističkih programa za izračunavanje f_3 i D -statistike: *qp3Pop* program za *outgroup* f_3 statistiku, *qpDstat* za D -statistiku, *qpAdm* za izračunavanje procenata porekla populacije (Patterson et al. 2012). *PLINK* je korišćen kako bi se Mokrin podaci u *.vcf* formatu kombinovani sa referentnim genomima, kao i za konvertovanje fajlova koji su potom spojeni u *EIGENSTRAT* format koristeći program *convertf*, takođe sastavni deo *Admixtools*-a. Prednost ovih metoda je u tome što se mogu koristiti i na uzorcima sekvenciranim na maloj dubini. Korišćeni su sa preporučenim parametrima i na pozicijama definisanim *HOIII* setom pojedinačnih nukleotidnih polimorfizama (Haak et al. 2015). Značajnost rezultata je zasnovana na Z skor (opcija *--jackknife*). Ukoliko je $Z > 3$, rezultat je značajno pozitivan, dok ukoliko je $Z < -3$, rezultat je značajno negativan.

Populacija sa Mokrina je upoređena sa *Khomani outgroup* grupom i referentnim genomima uzetim na osnovu prethodnih studija ($F_3(Khomani, test, Mok)$). Posebna pažnja je posvećena uzorcima koji pripadaju moriškoj kulturi i nađeni su na prostoru današnje Mađarske - RISE371.SG, RISE373.SG i RISE374.SG. U drugoj analizi, test populacije su izostavljene, a uzorci sa Mokrina su bili međusobno poređeni ($F_3(Khomani, MokX, MokY)$) radi ispitivanja genetičke sličnosti i strukturiranosti populacije (potencijalnog grupisanja unutar populacije).

3.2.4.4. Koeficijent inbridinga – f

Isključivo sekvence visokog kvaliteta, koje su mogle biti determinisane u više od 10 uzoraka, korišćene su za procenjivanje koeficijent inbridinga (f) programom *ATLAS*, opcija *--inbreeding* (Burger et al. 2020) kako bi se detektovalo postojanje potencijalne populacione strukture između uzoraka sa Mokrina. Očekivano je da koeficijent inbridinga

bude pozitivan u strukturiranoj populaciji usled opadanja broja heterozigotnih genotipova i Valundovog efekta.

3.2.5. Funkcionalni markeri

Učestalosti alela određenih funkcionalnih markera, odnosno pojedinačnih nukleotidnih polimorfizama čija učestalost u populaciji zavisi od pravaca i intenziteta delovanja prirodne selekcije (Mathieson et al. 2015; Veeramah et al. 2018) procenjene su na osnovu *.vcf* fajlova koristeći Bayesian pristup u programu *ATLAS* (commit 52a2276, task alleleFreq, doBayesian) (Burger et al. 2020). Razlike u učestalostima alela u savremenim populacijama za funkcionalne markere ispitana je procenom vrednosti F_{ST} (Bhatia et al. 2013). Budući da ne postoji direktna referentna populacija iz regiona odakle se može pretpostaviti da uzorci sa Mokrina potiču, učestalosti alela bile su upoređene sa četiri referentne populacije iz Evrope iz projekta 1000 Genoma (96 uzoraka iz CEU - savremene centralne evropske populacije, 88 uzoraka GBR - Velika Britanija, 104 uzoraka IBS - Iberija i 107 uzoraka TSI - Toskana) (1000 Genomes project consortium et al. 2012), i dobijeni su uz pomoć softvera *vcftools* (Danecek et al. 2011). Podaci su spojeni programom *PLINK* i *python* skriptom.

Kako bi se procenila promena učestalosti alela za toleranciju na mleko - rs4988235, a potom i koeficijent selekcije za ovaj alel, učestalost ovog alela na Mokrinu je upoređena sa 14 individua sa arheološkog nalazišta Tolens u Nemačkoj (1,200 godine p.n.e.), 37 individua poreklom iz istočnih stepa (4,000 - 2,000 godine p.n.e.) i savremenim uzorcima. Program *ATLAS* je korišćen kako bi se uporedile učestalosti alela (task = compareAlleleFreq, commit 8af19b9) (Burger et al. 2020), a program *ApproxWF* (Admetilla et al. 2016) za procenu koeficijenta selekcije na specifičnom lokusu, sa opcijama za konstantnu efektivnu veličinu populacije i greškom sekvenciranja. Individue koje su u srodstvu bile su isključene iz analiza. Ove analize rađene su u kolaboraciji sa Univerzitetom u Friburgu u Švajcarskoj.

Procena funkcionalnih markera proverena je programom *PhenoReport* koji polazeći od *.bam* i *.vcf* fajlova detektuje polimorfizme za ukupno 52 monogenske i 30 poligenske osobine (Pukaj 2021). Koristeći *.vcf* fajlove, određeni alel se detektuje (0: nije prisutan, 1: heterozigot, 2: homozigot), a na osnovu načina njegovog nasleđivanja i efektivne interakcije između alela na istom lokusu procenjuje se prisustvo određene

osobine - dva alela u genotipu u slučaju recesivne osobine i najmanje jedan dominantan alel neophodan za dominantan fenotip. Alternativno, program koristi *.bam* fajlove koji ne pružaju informaciju o genotipu nego o bazama na određenim pozicijama, čime je pouzdanost rezultata manja ukoliko sekvence nisu prošle korake za proveru kvaliteta i rekalkibracije. Takođe, u sklopu *PhenoReport*-a nalaze se i programi za procenu haplogrupa (*haplogrep* i *yleaf*), a u upotrebi je i softver *Hirisplex-S*⁴⁶ (Chaitanya et al. 2018) koji koristi genotipove za fenotipsku predikciju i rekonstrukciju boje kože, očiju i kose i poredi varijacije za određeni marker u drevnim i modernim populacijama.

⁴⁶ <https://hirisplex.erasmusmc.nl/>

4. REZULTATI

4.1. Skrining uzoraka

U cilju procene zastupljenosti endogene DNK u drevnim uzorcima, 24 petrozne kosti sa Mokrina sekvencirane su na *MiSeq Illumina* platformi sa jednog kraja i dužinom sekvenci od 50 bp. Sekvenciranje je rezultovalo u 709,737 sirovih sekvenci u proseku, koje su procesuirane specifičnim bioinformatičkim metodama za drevnu DNK. Nakon uklanjanja duplikata iz analiza izračunat je procenat endogene DNK u uzorku koji predstavlja odnos jedinstvenih sekvenci poravnatih na referentni genom i ukupnim brojem sekvenci koje su prošle kontrolu kvaliteta. Proporcija endogene DNK uzoraka sa Mokrina varira od 8% do 70%, sa samo dva uzorka ispod 20% (individue iz groba 211 i 224), što svedoči o dobroj molekularnoj očuvanosti odabranih skeletnih ostataka, ali i da očuvanost DNK varira čak i u okviru iste nekropole i uslovima skladištenja i zavisi od mnogobrojnih faktora. Rezultati skrininga prikazani su u tabeli 4.1., a procenat duplikata i endogene DNK izračunat je po sledećim formulama:

$$\text{Duplikati (\%)} = \frac{(\text{poravnate sekv.} - \text{sekv. nakon odstranjivanja duplikata})}{\text{poravnate sekv.}} \times 100$$

$$\text{Endo. DNA (\%)} = \frac{\text{Sekvence nakon odstranjivanja duplikata}}{\text{Sekvence nakon proverre kvaliteta}} \times 100$$

4.2. Duboko sekvenciranje

Uzorci su pulovani na osnovu koncentracije biblioteka i prethodno procenjene količine DNK u svakom uzorku kako bi se dobila dubina sekvenciranja od 1X. Čak i u slučaju kada je procenat endogene DNK veoma nizak (5-8% za individuu 211), postojao je dovoljan broj sekvenci za postizanje određene dubine sekvenciranja. Nakon obrade sirovih podataka dobijenih sekvenciranjem na *NovaSeq Illumina 6000* platformi, izračunat je procenat duplikata i endogene DNK (Tabela 4.2.). Postoje minimalne razlike u proceni endogene DNK na drugačijim platformama za sekvenciranje zbog očitavanja različitih biblioteka i tretmana *USER* enzimom koji povećava fragmentaciju, te je više sekvenci isključeno iz analiza. Takođe, prilikom sekvenciranja sa oba kraja dolazi do

dodatnog gubitka očitavanja, jer se sekvence koje ne nađu svog para odstranjuju iz analiza.

Tabela 4.1. Obrada podataka i procena endogene DNK nakon sekvenciranja na *MiSeq Illumina* platformi.

* Sekvence koje su prošle proveru kvaliteta, tj. sadrže 95% baza koje dostižu prag kvaliteta iznad 15.

Lab.broj	Grob	Sirove sekvence	Sekvence nakon trimovanja	Sekvence nakon provere kvaliteta*	Poravnate sekvence	Sekvence nakon odstranjivanja duplikata	Sekvence nakon filtera za njihovu dužinu	Procenat duplikata [%]	Endogena DNK [%]
Mok 9b	237	714070	714061	708825	374252	374022	364612	0.0615	52.7665
Mok 12	122E	646445	646439	639430	233131	232972	219370	0.0682	36.4343
Mok 13	122S	884330	884323	878212	455598	455231	437405	0.0806	51.8361
Mok 14	161	730244	730238	724576	370294	370103	361429	0.0516	51.0786
Mok 15	163	642998	642991	637433	296456	296190	291061	0.0897	46.4661
Mok 16a	181	152639	152638	151862	91720	91689	89613	0.0338	60.3765
Mok 17a	186	727900	727891	723065	395708	395291	384537	0.1054	54.6688
Mok 18a	211	450126	450119	441604	37754	37744	35499	0.0265	8.547
Mok 19a	220	895220	895219	892057	609577	608986	597556	0.097	68.2676
Mok 20	223	790460	790454	782950	380953	380737	367464	0.0567	48.6285
Mok 21a	224	557587	557582	547940	96960	96935	91559	0.0258	17.6908
Mok 22	225	618748	618743	614352	380634	380310	375895	0.0851	61.9042
Mok 23	228	776385	776379	773630	531816	531398	518180	0.0786	68.6889
Mok 24a	243	824841	824837	821350	551680	551268	541116	0.0747	67.1173
Mok 25a	246	742948	742944	740133	494740	494304	481128	0.0881	66.7858
Mok 26a	247	775488	775485	772759	538497	538168	526451	0.0611	69.6424
Mok 10b	257A	852410	852401	849602	589070	588486	573671	0.0991	69.2661
Mok 27	257B	459521	459514	454912	200830	200747	195003	0.0413	44.1287
Mok 28a	260	685143	685135	682380	448460	448095	435796	0.0814	65.6665
Mok 29a	282	860515	860511	857623	607172	606781	597171	0.0644	70.7515
Mok 30	287	870381	870377	866881	595156	594592	582529	0.0948	68.5898
Mok 31	288	776164	776157	770819	432931	432652	417467	0.0644	56.1289
Mok 32	295	987532	987521	983176	595133	594617	583904	0.0867	60.4792
Mok 33	302	611581	611577	607977	336014	335823	328409	0.0568	55.2361

Prosečna postignuta dubina sekvenciranja iznosila je $0.85X \pm 0.25$ (od $0.33X$ do $1.41X$) na autozomima (Tabela 4.2.). Standardna devijacija računata je po formuli: $\sigma =$

$$\sqrt{\frac{\sum (x_i - \mu)^2}{N}}$$

Svi genomi su dostupni na Internet stranici *European Nucleotide Archive*, pod brojem PRJEB38643 u *.bam* i *fastq* formatu.

Tabela 4.2. Obrada podataka i procena endogene DNK nakon sekvenciranja na *NovaSeq Illumina 6000* platformi.

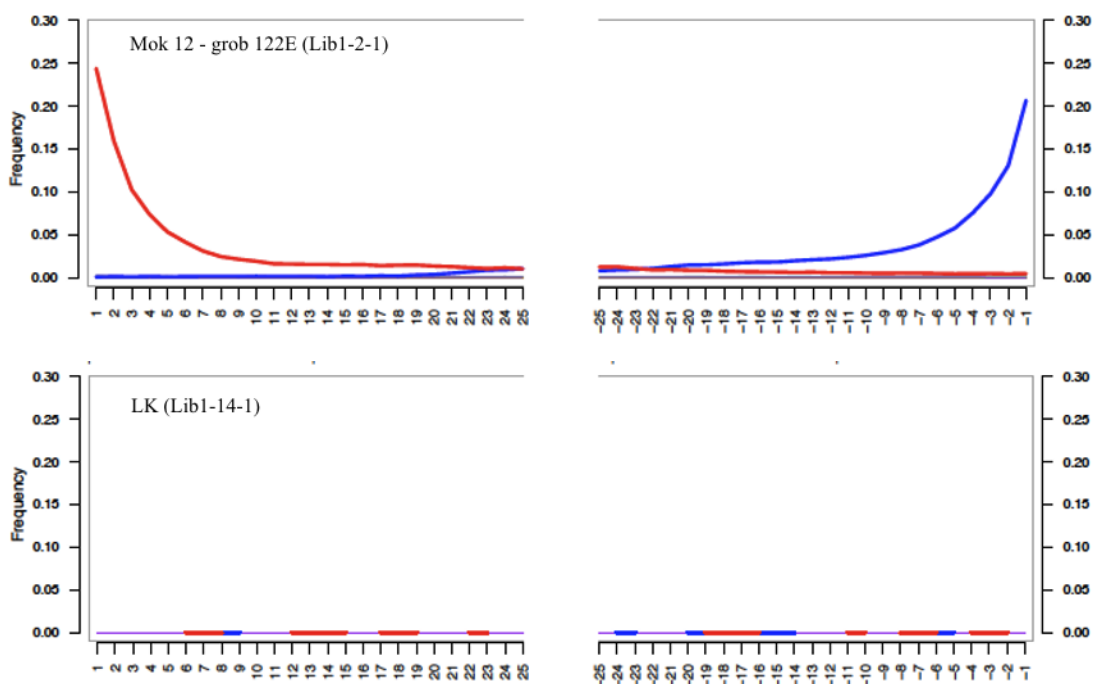
Lab.broj	Grob	Procenat duplikata [%]	Endogena DNK [%]	Dubina sekvenciranja
Mok 9b	237	3.46	38.19	0.89
Mok 12	122E	3.75	24.79	1.09
Mok 13	122S	3.76	36.45	0.78
Mok 14	161	3.18	35.09	1.20
Mok 15	163	4.35	35.33	1.21
Mok 16a	181	3.74	46.47	0.62
Mok 17a	186	3.25	41.12	0.33
Mok 18a	211	4.05	5.05	0.79
Mok 19a	220	3.25	52.76	0.64
Mok 20	223	3.35	37.08	0.39
Mok 21a	224	3.19	12.37	0.77
Mok 22	225	6.82	47.43	0.82
Mok 23	228	7.75	53.39	0.95
Mok 24a	243	3.61	49.58	1.12
Mok 25a	246	3.72	52.02	0.98
Mok 26a	247	7.87	52.48	0.90
Mok 10b	257A	7.64	55.69	0.60
Mok 27	257B	7.24	29.32	0.61
Mok 28a	260	7.99	50.00	0.92
Mok 29a	282	8.01	51.94	1.41
Mok 30	287	6.74	53.00	0.81
Mok 31	288	7.49	43.02	0.81
Mok 32	295	7.42	44.20	0.82
Mok 33	302	7.89	42.99	0.89

4.3. Provera autentičnosti rezultata

Osnovni kriterijum za proveru autentičnosti drevne DNK jeste mala dužina fragmenata koja najčešće ne prelazi 100 bp, dok se duži fragmenti (500 – 1000 bp) smatraju rezultatom kontaminacije. Nakon dubokog sekvenciranja na *NovaSeq Illumina 6000* platformi, prosečna dužina fragmenata uzoraka sa Mokrina iznosila je od 47.29 do 57.38 bp (Tabela 4.3.). Međutim, za očekivati je da je *USER* tretman dodatno doveo do fragmentacije molekula i da je dužina fragmenata manja posle dubokog sekvenciranja.

Odlična očuvanost uzoraka takođe je potvrđena programom *MapDamage 2.0* za biblioteke koje nisu tretirane *USER* enzimom. Deaminacija na prvoj bazi 5' kraja sekvenci iznosi od 0.13 – 0.26 (Tabela 4.3., Slika 4.1.), što u kombinaciji sa malom dužinom fragmenata, koja u proseku iznosi 53.6 bp, podržava autentičnost rezultata. Step deaminacije zavisi i od skeletnog elementa koji se uzorkuje, ali s obzirom da je drevna DNK svih uzoraka izdvojena iz petroznih kosti ne uočava se značajnije variranje.

Dodatno, nizak nivo mitohondrijske kontaminacije (<1%) utvrđen je i programom *contamMix* (Fu et al. 2016) nakon dubokog sekvenciranja (Tabela 4.3.). Takođe, nije detektovana heterozigotnost kod haploidnih lokusa (mtDNK i nerekombinovani deo Y hromozoma i X hromozoma kod muškaraca).

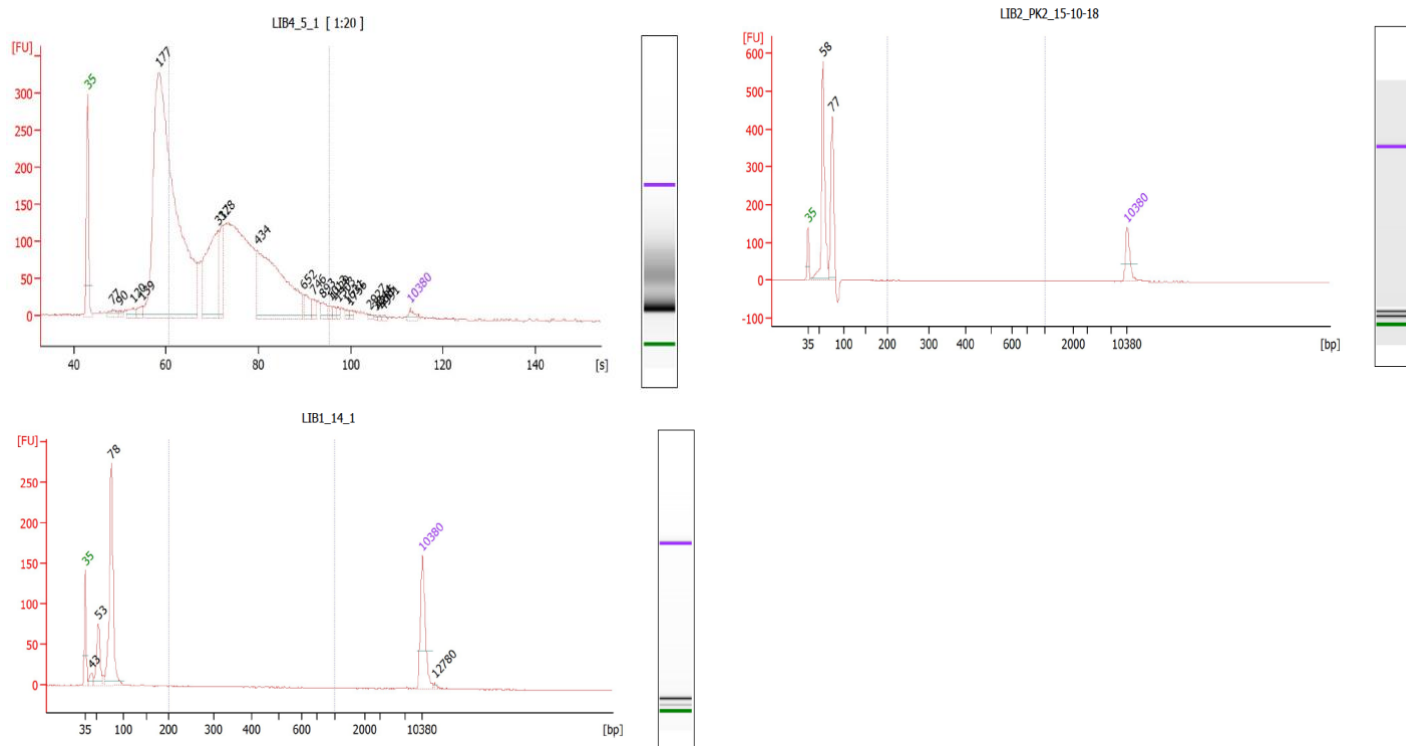


Slika 4.1. Primeri obrazca oštećenja karakterističnog za drevnu DNK. X-osa označava poziciju baze, dok y-osa predstavlja učestalost tranzicija C u T na 5' kraju (crvena boja) i G u A na 3' kraju (plava boja), dobijenih programom *MapDamage* nakon plitkog sekvenciranja na *MiSeq Illumina* platformi za uzorak (122E) i kontrolu (LK).

Tabela 4.3. Prosečna dužina sekvenci i procena kontaminacije *MapDamage* i *ContaMix* softverom za uzorke sa Mokrina.

Lab.broj	Grob	Dužina sekvenci	5´ C-T na prvoj poziciji	3´ G-A na prvoj poziciji	Greška	Autentične sekvence
Mok 9B	237	53.76	0.16	0.10	3.00E-04	0.9998788
Mok 12	122E	48.74	0.24	0.21	6.00E-04	0.9996691
Mok 13	122S	51.51	0.19	0.13	8.00E-04	0.9998111
Mok 14	161	55.04	0.14	0.08	5.00E-04	0.9967753
Mok 15	163	54.65	0.17	0.09	4.00E-04	0.9990109
Mok 16a	181	53.27	0.19	0.11	6.00E-04	0.9997659
Mok 17a	186	53.30	0.18	0.11	5.00E-04	0.9998227
Mok 18a	211	47.29	0.26	0.21	5.00E-04	0.9994216
Mok 19a	220	54.55	0.17	0.09	4.00E-04	0.9929535
Mok 20	223	52.22	0.17	0.12	5.00E-04	0.9997578
Mok 21a	224	48.73	0.22	0.18	5.00E-04	0.9930579
Mok 22	225	57.38	0.17	0.05	4.00E-04	0.9970579
Mok 23	228	54.03	0.18	0.10	4.00E-04	0.9998199
Mok 24a	243	55.59	0.15	0.07	4.00E-04	0.9995789
Mok 25a	246	53.95	0.17	0.10	5.00E-04	0.9996178
Mok 26a	247	54.67	0.15	0.08	4.00E-04	0.9998358
Mok 10B	257a	52.88	0.19	0.11	5.00E-04	0.9993889
Mok 27	257B	55.30	0.13	0.07	5.00E-04	0.994112
Mok 28a	260	54.23	0.15	0.09	4.00E-04	0.9996998
Mok 29a	282	56.08	0.14	0.07	4.00E-04	0.9851043
Mok 30	287	55.12	0.15	0.08	4.00E-04	0.9998323
Mok 31	288	52.44	0.19	0.12	6.00E-04	0.999708
Mok 32	295	55.61	0.15	0.07	4.00E-04	0.9962457
Mok 33	302	55.97	0.14	0.07	4.00E-04	0.9990027

Negativne kontrole nisu pokazale tragove kontaminacije na *MiSeq Illumina* platformi, kao ni fragment analizom na *Agilent Bioanalyzer*-u (Slika 4.2.).



Slika 4.2. Primeri elektroforegrama dobijenih fragment analizom (Agilent Bioanalyzer). Na slici su prikazani jedna biblioteka uzorka Mok29a (LIB4_5_1), negativna kontrola (LIB1_14_1) i PCR kontrola (LIB2_PK2_15-10-18). x osa - očitava veličinu molekula (broj baznih parova); y osa - očitava intenzitet signala.

4.4. Određivanje pola

Metodom Skoglund *i saradnici* (2013) utvrđeno je 14 ženskih i 10 muških individua (Tabela 4.4.). Ova metoda nije dala pouzdan rezultat samo u slučaju individue sahranjene u grobu 211. Naime, sekvence su bile mapirane na X i Y hromozome, tj. sugerisan je XY kariotip koji je bio u saglasnosti sa antropološkom analizom, ali nivo pouzdanosti nije bio zadovoljavajući. Nepouzdanost ovog rezultata može biti posledica nedovoljnog broja dobijenih sekvenci, različite veličine X i Y hromozoma, ili degradacije i oštećenja nakon smrti organizama. Muški pol ove individue ipak je nesumnjivo potvrđen metodom Cassidy *i saradnici* (2020).

Postoje tri neslaganja između molekularnog i arheološkog određivanja pola, odnosno određivanja pola na osnovu normativne funerarne prakse u Mokrinu (Girić 1971): kod individua 122S, 220 i 257B. Individue 257B i 122S su iz dvojnog i trojnog

groba, koji su izuzetak na Mokrinu, te je moguće da i položaj ovih individua može odstupati od klasičnog obrasca sahranjivanja.

Kontrole nakon skrininga nisu raspolagale sa dovoljno sekvenci kako bi pol bio nesumnjivo određen.

Tabela 4.4. Određivanje pola (Skoglund et al. 2013, Cassidy et al. 2020). Pol se može odrediti i nakon dubokog sekvenciranja i nakon skrininga. Samo dve kontrole su dale rezultat nakon sekvenciranja na *MiSeq Illumina* platformi. N = ukupan broj sekvenci, N_Y = broj sekvenci na Y hromozomu, N_X = broj sekvenci na X hromozomu, Ry = odnos broja Y sekvenci u odnosu na ukupan broj sekvenci na polnim hromozomima, SE = standardna greška, CI = interval poverenja, Na = nepoznato.

Lab.broj	Grob	N	N_Y+N_X	N_Y	Ry	SE	95% CI	Pol
Mok 9B	237	52806950	2634140	5853	0.0022	0	0.0022-0.0023	XX
Mok 12	122E	39836683	1139161	89096	0.0782	0.0003	0.0777-0.0787	XY
Mok 13	122S	68055935	3463610	8659	0.0025	0	0.0024-0.0026	XX
Mok 14	161	45447494	2279376	5012	0.0022	0	0.0021-0.0023	XX
Mok 15	163	70089798	1963143	159133	0.0811	0.0002	0.0807-0.0814	XY
Mok 16a	181	73299351	3701882	8771	0.0024	0	0.0023-0.0024	XX
Mok 17a	186	37465491	1846298	4910	0.0027	0	0.0026-0.0027	XX
Mok 18a	211	22587267	641172	45993	0.0717	0.0003	0.0711-0.0724	XY
Mok 19a	220	46207454	1303408	104967	0.0805	0.0002	0.0801-0.081	XY
Mok 20	223	39178684	1979534	4533	0.0023	0	0.0022-0.0024	XX
Mok 21a	224	25621944	1300086	3080	0.0024	0	0.0023-0.0025	XX
Mok 22	225	44269060	1242131	101223	0.0815	0.0002	0.081-0.082	XY
Mok 23	228	50972495	2544729	5772	0.0023	0	0.0022-0.0023	XX
Mok 24a	243	54268369	1526010	122838	0.0805	0.0002	0.0801-0.0809	XY
Mok 25a	246	66535034	3335841	8058	0.0024	0	0.0024-0.0025	XX
Mok 26a	247	60036548	2992613	7191	0.0024	0	0.0023-0.0025	XX
Mok 10B	257a	57028156	2855328	7057	0.0025	0	0.0024-0.0025	XX
Mok 27	257B	36435648	1033088	83612	0.0809	0.0003	0.0804-0.0815	XY
Mok 28a	260	56651208	1589793	128549	0.0809	0.0002	0.0804-0.0813	XY
Mok 29a	282	83223480	2336244	188509	0.0807	0.0002	0.0803-0.081	XY
Mok 30	287	48838966	2440440	5859	0.0024	0	0.0023-0.0025	XX
Mok 31	288	51399176	2568817	6141	0.0024	0	0.0023-0.0025	XX
Mok 32	295	48709188	1369940	110264	0.0805	0.0002	0.08-0.0809	XY
Mok 33	302	53433740	2673649	6363	0.0024	0	0.0023-0.0024	XX
Lib1-14-1	LK1	116	6	0	0	0	0.0-0.0	određena poklapanja sa XX
SL28-9-1	MK	237	7	1	0.1429	0.1323	-0.5185	Na

4.5. Uniparentalni markeri

Uniparentalni markeri pokazuju relativno veliki diverzitet i za mtDNK ($\hat{h} = 0.95$) i za nerekombinovani deo Y hromozoma (NRY, $\hat{h} = 0.81$) (Tabela 4.5.). U uzorku Mokrina prisutno je 14 različitih haplogrupa mtDNK. Šest individua pripada haplogrupi U (jedna individua grupi U3, dve grupi U4 i tri grupi U5) koja je karakteristična za lovce sakupljače u centralnoj Evropi (Bramanti et al. 2009). Ostale individue pripadaju grupama H (njih deset), T2 (tri individue), K1 (jedna individua) i J1 (četiri individue).

Prema proceni programa *yhaplo*, prisutno je pet haplogrupa Y hromozoma među deset muških individua, od kojih 3 individue imaju R1b haplogrupu, uobičajnu haplogrupu za savremene evropske populacije (Haak et al. 2015). Četiri individue imaju I2, jedna individua ima J2 i dve individue imaju BT haplogrupu. Treba napomenuti da je program *yleaf* u sastavu programa *PhenoReport* za dve muške individue (243 i 282) procenio drugačije haplogrupe: R1b1a1b1b3a1a i I2a1a1b1 haplogrupu.

Tabela 4.5. Određivanje haplogrupa za individue sa Mokrina.

Grob	Genetički pol	Starost	Mt-hg (<i>Haplogrep</i>)	Y-hg (<i>yhaplo</i>)
122E	XY	6-9	U5a2b1a	I2a1b
122S	XX	35-50	H32	*
161	XX	9-11	H80	*
163	XY	45-55	U4a2	J2b
181	XX	>18	U4a2	*
186	XX	8-11	H1aj	*
211	XY	50-55	U5a2b1a	I2a1b
220	XY	15-25	T2b11	R1b1a2a2c1
223	XX	7-10	U3a1	*
224	XX	25-40	T2b	*
225	XY	25-35	J1b1a1	R1b1a2a2c1
228	XX	35-50	J1c	*
237	XX	15-20	T2b	*
243	XY	20-35	H	BT
246	XX	45-50	H80	*
247	XX	10-12	H1	*
257A	XX	40-60	H	*
257B	XY	inf. I	K1a4	R1b1a2a2c1a1
260	XY	15-18	J1c	I2a2a1a2a2
282	XY	15-20	H2b	BT
287	XX	20-35	U5b2a2c	*
288	XX	60+	HV0e	*
295	XY	15-20	H80	I2a1a
302	XX	20-35	J1c	*

4.6. Analize srodstva

Polazeći od uobičajene F_{ST} vrednosti za strukturiranost populacija od 0.03, dobijene $\hat{\pi}$ vrednosti veće od 0.08 ukazuju na to da su individue u srodstvu, dok vrednosti za parove individua koje su bile jednake ili manje od 0.004, ukazuju da individue najverovatnije nisu srodnici (Prilog 2, Tabela 4.6.). Dakle, analiza srodstva *lcMLkin* programom utvrdila je da se među individuama sa Mokrina može detektovati 9 porodičnih veza koje uključuju 15 individua (Tabela 4.7.). Ovi rezultati potvrđeni su i *READ* softverom koji pruža grafički prikaz sa procenom grešaka i klasifikaciju rezultata na osnovu srodstva (Slika 4.3.). Međutim, *READ* nije u mogućnosti da prikaže tačan odnos veza, npr. majka - ćerka ili brat i sestra. Među devet porodičnih veza, detektovane su tri roditeljske veze, dva brata, brat i sestra, tri veze drugog kolena (npr. unuk i baka ili deka, ujak i sestrić, ili polubraća i polusestre), kao i jedna rođačka veza. Devet ženskih individua (186, 122S, 223, 224, 237, 246, 247, 287, 302) nisu bile u srodstvu ni sa jednom individuom.

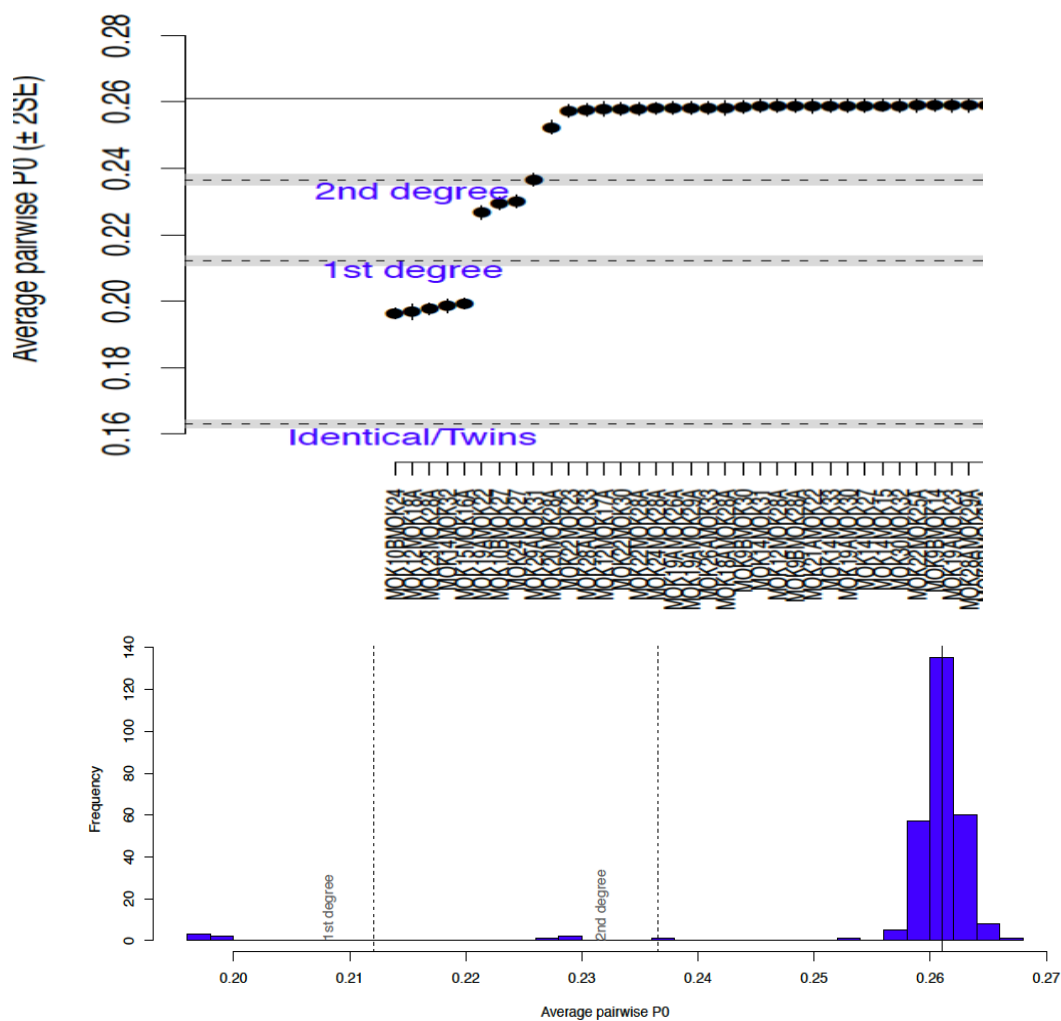
Tabela 4.6. *lcMLkin* tabela sa dobijenim vrednostima za $F_{ST} = 0.03$. Na slici su prikazane individue za koje je utvrđeno srodstvo i nekoliko nesrodnih individua. Kompletna tabela sa vrednostima može se naći u Prilogu 2. k_0 = verovatnoća da individue dele 0 alela koji su identični po poreklu, k_1 = verovatnoća da individue dele 1 alel koji su identični po poreklu, k_2 = verovatnoća da individue dele 2 alela koji su identični po poreklu.

Ind. 1	Grob	Ind. 2	Grob	k_0	k_1	k_2	$\hat{\pi}$
Mok 12	122E	Mok 18a	211	0.449	0.305	0.246	0.398
Mok 15	163	Mok 16a	181	0.306	0.629	0.065	0.379
Mok 10b	257A	Mok 24a	243	0.252	0.742	0.006	0.377
Mok 23	228	Mok 28a	260	0.342	0.565	0.092	0.375
Mok 14	161	Mok 32	295	0.45	0.381	0.169	0.36
Mok 19a	220	Mok 22	225	0.753	0.224	0.024	0.135
Mok 24a	243	Mok 27	257B	0.804	0.195	0	0.098
Mok 10b	257A	Mok 27	257B	0.835	0.13	0.035	0.1
Mok 29a	282	Mok 31	288	0.894	0.052	0.054	0.08
Mok 20	223	Mok 28a	260	0.992	0.008	0	0.004
Mok 12	122E	Mok 17a	186	0.994	0.006	0	0.003
Mok 17a	186	Mok 18a	211	0.995	0.005	0	0.002
Mok 22	225	Mok 23	228	0.995	0.004	0.001	0.003
Mok 21a	224	Mok 22	225	0.995	0.005	0	0.002
Mok 12	122E	Mok 23	228	0.996	0.004	0	0.002
Mok 19a	220	Mok 23	228	0.996	0.004	0	0.002
Mok 21a	224	Mok 23	228	0.996	0.004	0	0.002
Mok 22	225	Mok 28a	260	0.996	0.004	0	0.002
Mok 18a	211	Mok 23	228	0.996	0.004	0	0.002
Mok 28a	260	Mok 9b	237	0.996	0.004	0	0.002
Mok 12	122E	Mok 15	163	0.997	0.003	0	0.002

Mok 13	122S	Mok 25a	246	0.996	0.004	0	0.002
Mok 13	122S	Mok 23	228	0.996	0.004	0	0.002
Mok 18a	211	Mok 28a	260	0.997	0.003	0	0.002
Mok 16a	181	Mok 26a	247	0.996	0.004	0	0.002
Mok 17a	186	Mok 31	288	0.996	0.004	0	0.002
Mok 21a	224	Mok 28a	260	0.996	0.004	0	0.002
Mok 23	228	Mok 30	287	0.996	0.004	0	0.002
Mok 23	228	Mok 33	302	0.996	0.004	0	0.002
Mok 12	122E	Mok 16a	181	0.997	0.003	0	0.002
Mok 12	122E	Mok 22	225	0.996	0.004	0	0.002
Mok 12	122E	Mok 29a	282	0.997	0.003	0	0.002
Mok 13	122S	Mok 21a	224	0.995	0.005	0	0.002
Mok 22	225	Mok 33	302	0.996	0.004	0	0.002
Mok 10b	257A	Mok 12	122E	0.997	0.003	0	0.002
Mok 10b	257A	Mok 13	122S	0.997	0.003	0	0.002

Tabela 4.7. Utvrđene srodničke veze individua sa Mokrina. Srodstvo je dobijeno *lcMLkin* i *READ* programom.

Biološka veza	Individua 1		Individua 2	
	Grob	Pol i starost	Grob	Pol i starost
Roditelj - potomak				
	257A	♀, odrasla ind.	243	♂, odrasla ind.
	228	♀, zrela ind.	260	♂, mlada ind.
	163	♂, odrasla ind.	181	♀, odrasla ind.
Braća i sestre				
	122E	♂, infant II	211	♂, zrela ind.
	161	♀, infant II	295	♂, mlada ind.
Drugi stepen srodstva (polubraća i sestre, ujak – sestrić i sl., baka, deka - unuk)				
	257B	♂, infant I	257A	♀, odrasla ind.
	257B	♂, infant I	243	♂, odrasla ind.
	220	♂, mlada ind.	225	♂, odrasla ind.
Rodaci				
	282	♂, mlada ind.	288	♀, starija ind.

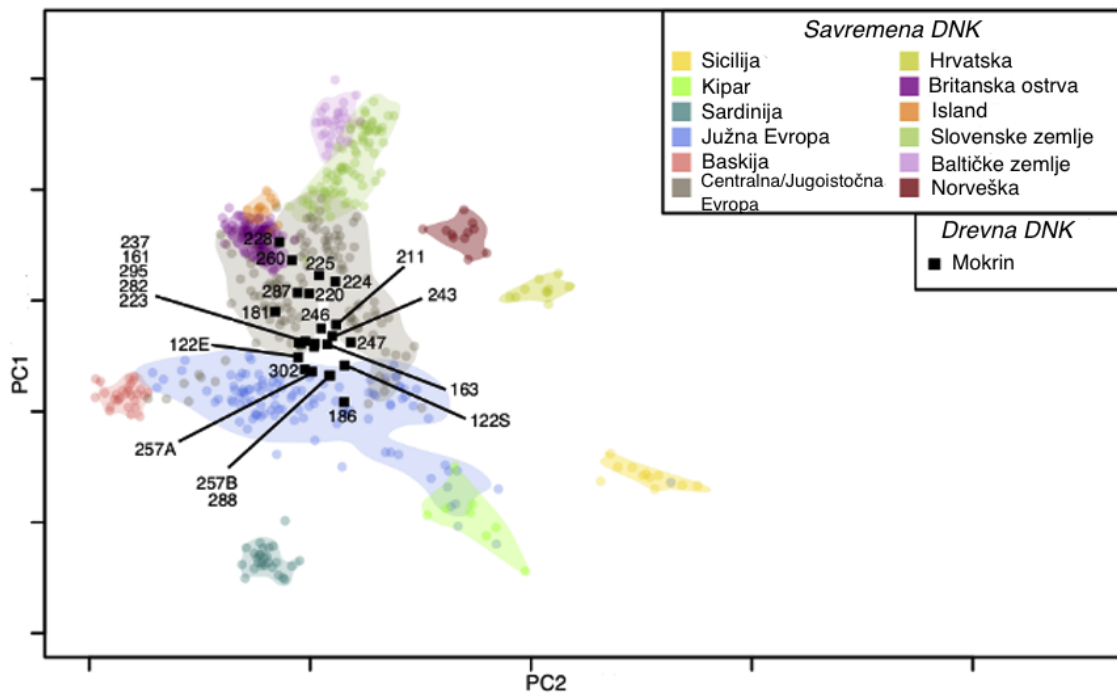


Slika 4.3. Parovi srodnika dobijeni *READ* programom. Ne-normalizivane P0 vrednosti za sva poređenja i uzorke sa Mokrina.

4.7. Populacione analize

4.7.1. PCA analiza

PCA analiza urađena je na osnovu 511,042 pojedinačna nukleotidna markera. Na PCA plotu drevni uzorci sa Mokrina su projektovani na referentni panel uzoraka iz savremenih ljudskih populacija iz Evrope (Slika 4.4.).

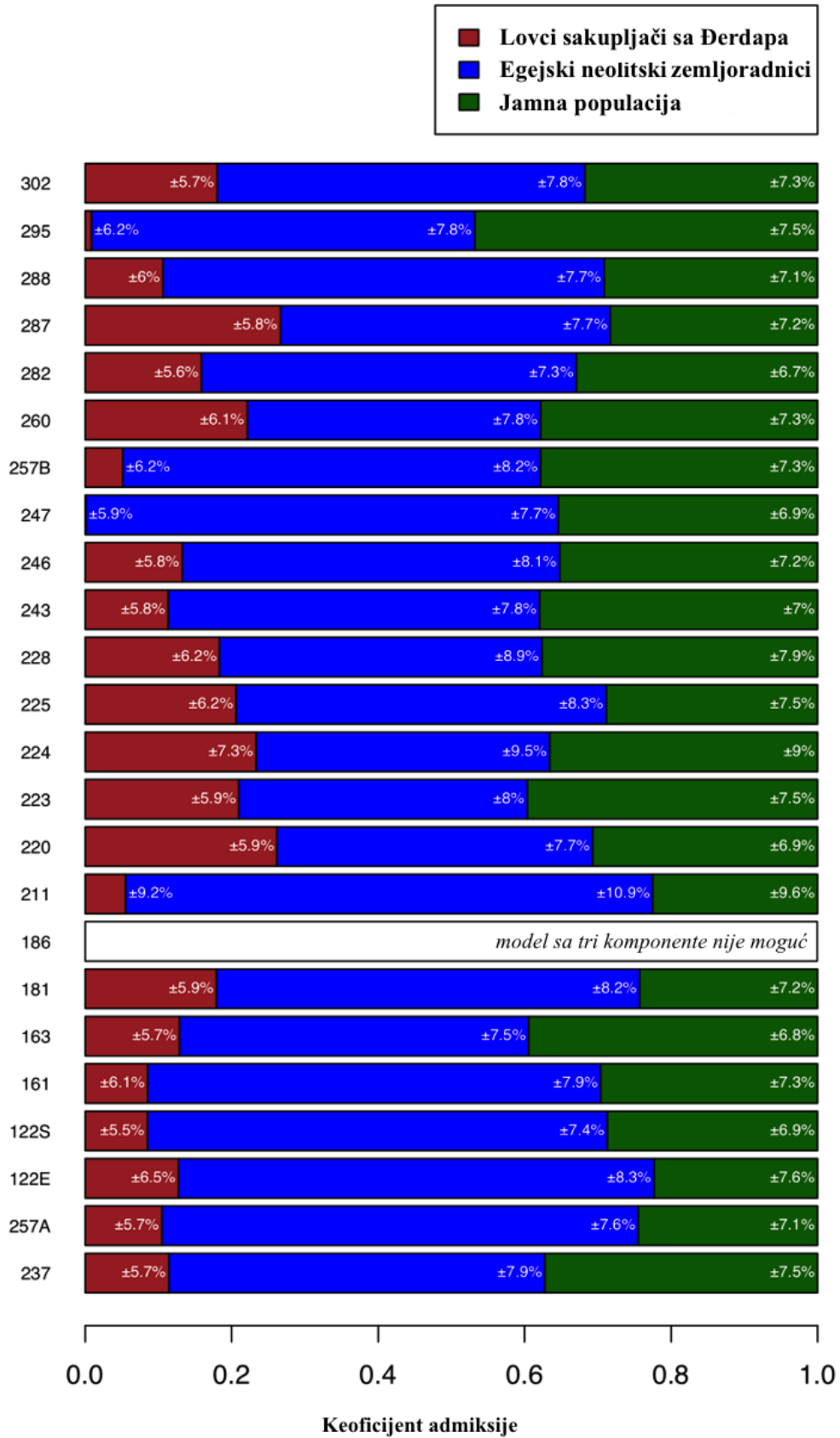


Slika 4.4. PCA plot sa uzorcima sa Mokrina i savremenim populacijama iz Evrope.

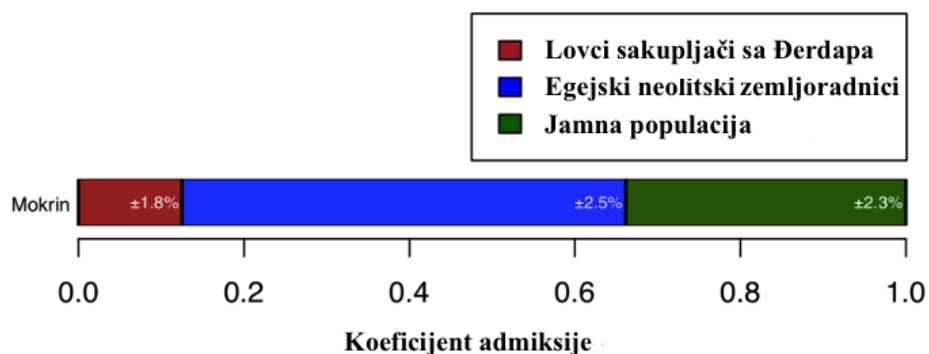
4.7.2. Analize porekla

Sa dobijenog grafika admiksije (Slika 4.5.) može se uočiti da se sve individue sa Mokrina, izuzev individue 186, mogu modelovati, tj. povezati poreklom sa tri predačke populacije: zapadni lovci sakupljači sa Đerdapa, neolitske zemljoradničko-stočarski zajednice iz Egeje i populacije iz stepa istočne Evrope. Takođe, individue sahranjene u grobovima 211, 247, 257B i 295 bolje se uklapaju u jednostavniji model sa dve predačke genetičke komponente, a isključuje lovce sakupljače.

Kada su individue posmatrane zajedno, proporcije genomske porekla su procenjene na 12.5% ($\pm 1.8\%$ SE) od lovaca sakupljača sa Đerdapa, 53.7% ($\pm 2.5\%$ SE) od neolitskih zemljoradničko-stočarskih zajednica iz Egeje i 33.8% ($\pm 2.3\%$ SE) od populacija iz stepa istočne Evrope (Slika 4.6.).



Slika 4.5. Individualne genetičke proporcije porekla.

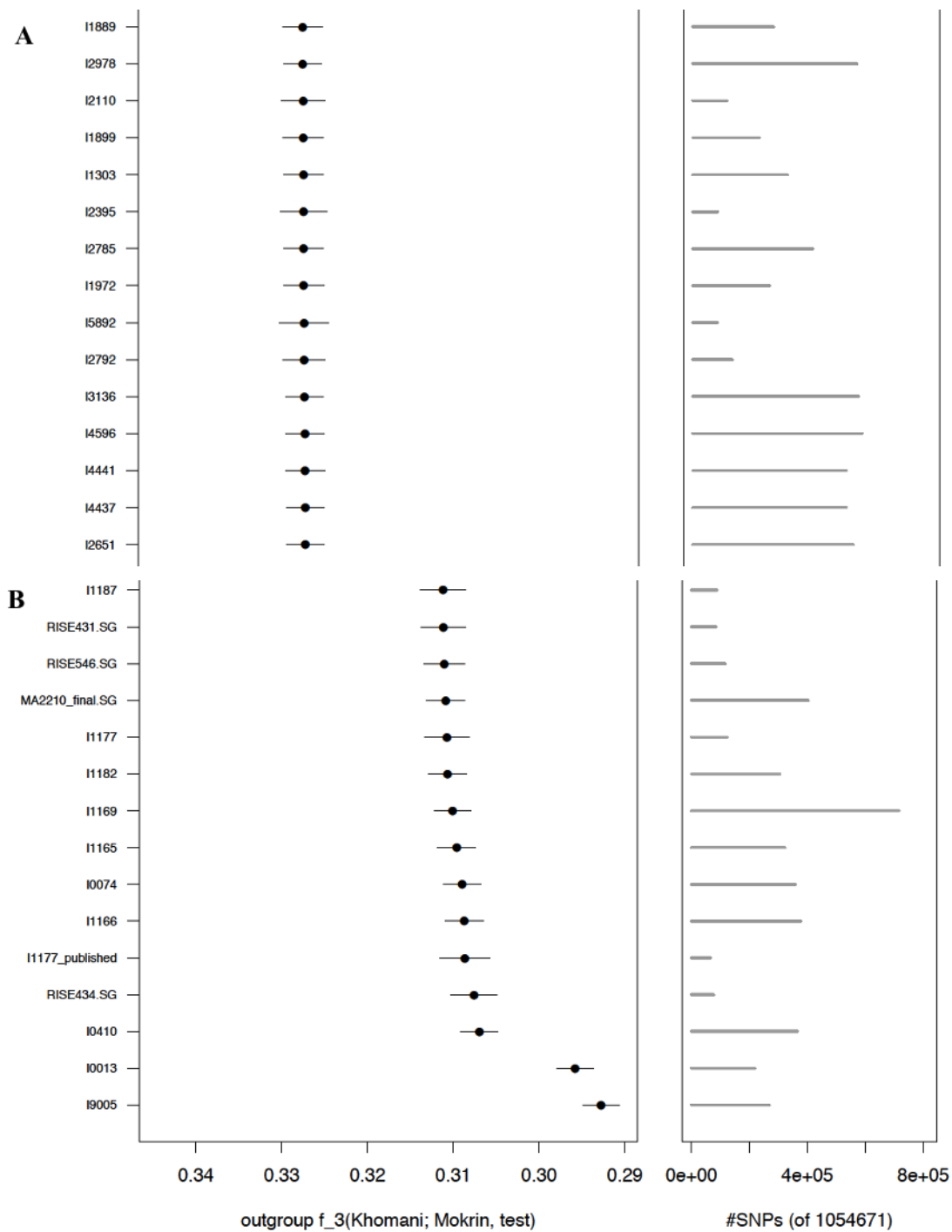


Slika 4.6. Procenjene proporcije genetičkog porekla svih individua sa Mokrina zajedno. Proporcije porekla iznosile su 12.5% od lovaca sakupljača sa Đerdapa, 53.7% od neolitskih zemljoradničko-stočarskih zajednica iz Egeje i 33.8% od populacija iz stepa istočne Evrope.

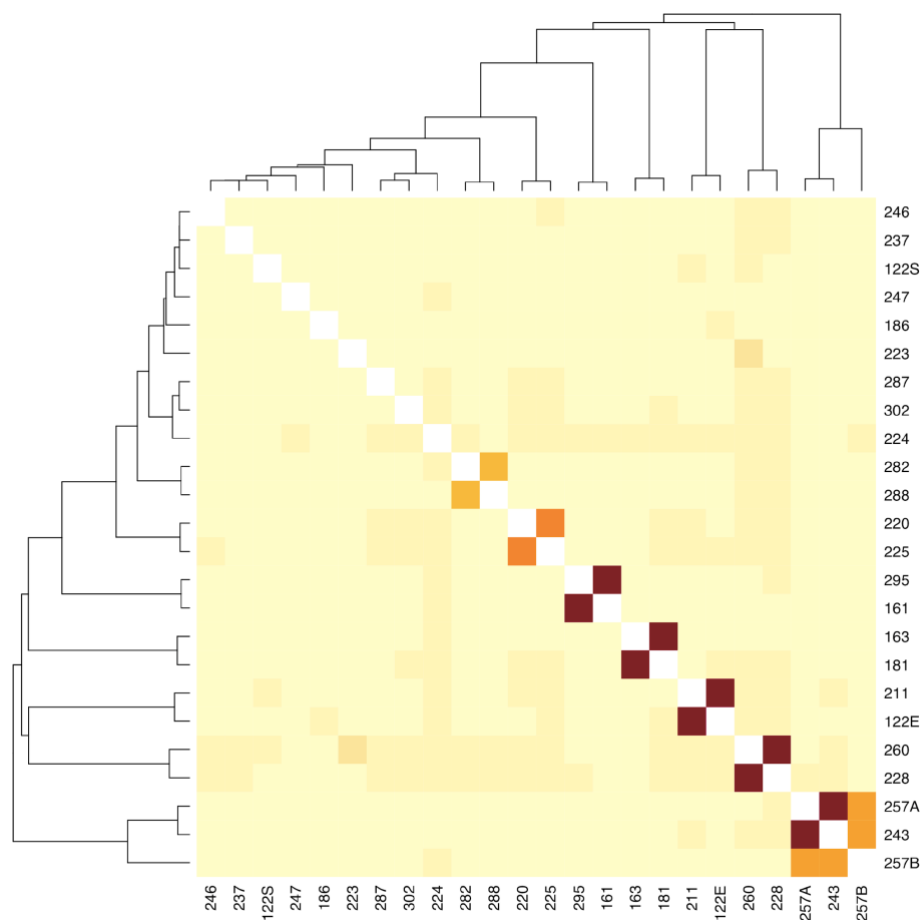
4.7.3. *Outgroup* f_3 statistika

Za poređenje populacije sa Mokrina sa drugim populacijama uzeti su uzorci stari od 4,000-8,000 godina iz baze podataka sa internet stranice Dejvida Rajha (Slika 4.7.). Korišćeno je 300,000 nukleotidnih polimorfizama koji su kod svih individua prisutni (Haak et al. 2015). Kao što je pomenuto, više vrednosti f_3 statistike ukazuju na veću genetičku sličnost uzoraka sa Mokrina i drugih drevnih uzoraka.

Međusobno poređenje uzoraka sa Mokrina ($F_3(Khomani, MokX, MokY)$) *outgroup* f_3 statistikom prikazano je na slici 4.8.



Slika 4.7. Outgroup f_3 statistika svih uzoraka sa Mokrina zajedno i drevnih individua iz baze podataka sa internet stranice Dejvida Rajha. A) Na slici je prikazano prvih 15 individua koje pokazuju najveću sličnost sa uzorcima sa Mokrina na osnovu pojedinačnih nukleotidnih polimorfizama. **B)** Na slici je prikazano poslednjih 15 individua koje pokazuju najmanju sličnost sa uzorcima sa Mokrina na osnovu pojedinačnih nukleotidnih polimorfizama.



Slika 4.8. *Outgroup* f_3 statistika između parova individua sa Mokrina potvrđuje prethodno definisane rodbinske veze.

4.7.4. Koeficijent inbridinga – f

Procenjeni koeficijent inbridinga u populaciji sa Mokrina iznosi $f=0$, što ukazuje na odsustvo genetičke strukturiranosti, uključujući i diferencijaciju između severnog i južnog mokrinskog lokaliteta. Kako bi se mogućnost strukturirane populacije definitivno isključila, analize su ponovljene sa opcijom $f > 0$, što je rezultovalo u srednjim vrednostima f od $1.3222e-05 \pm 1.2447e-05$.

4.8. Fenotipski markeri

Učestalost alela rs1426654*A (*SLC24A5*) na Mokrinu procenjena je kod 15 individua i iznosi 1 (0.8899–1) (Tabela 4.8.). Drugi alel asociran sa depigmentacijom kože rs16891982*G (*SLC45A2*) takođe je detektovan kod 15 individua sa Mokrina (Tabela 4.8.), a učestalost ovog alela iznosi 0.7098 (0.5365–0.8476).

20 individua sa Mokrina nosila su informaciju za izvedeni G alel na poziciji rs12913832 u *HERC2* genu, čija je učestalost procenjena na 0.4498 (0.2946–0.6127) (Tabela 4.8.).

Učestalost alela za toleranciju laktoze kod 18 uzoraka sa Mokrina je niska i iznosi 5,5% (Tabela 4.8.). Međutim, procenjena učestalost alela za toleranciju na laktozu preko programa *ATLAS* i najverovatnijim genotipovima iznosi 4.6% (0.0458; sa intervalom poverenja 90%: 0.001 - 0.145).

Procena koeficijenta selekcije za alele koji obezbeđuju toleranciju na laktozu zahteva poređenje učestalosti alela između drevnih i savremenih populacija, a da bi se utvrdilo selektivno favorizovanje, učestalost alela mora biti veća u savremenim uzorcima. Selekcioni koeficijent za toleranciju na laktozu u analizama sa mokrinskim uzorcima u odnosu na savremene populacije, Tolens i individuama iz istočne stepe procenjen je na vrednost 6% ($s = 0.06$).

PhenoReport nije bio efikasan u procenjivanju fenotipskih osobina verovatno usled male dubine sekvenciranja.

Tabela 4.8. Učestalosti funkcionalnih markera na osnovu .vcf. fajlova.

Uzorak	Grob	LCT rs4988235 (G>A)	HERC2 rs12913832 (A>G)	SLC45A2 rs16891982 (C>G)	SLC24A5 rs1426654 (G>A)
Pozicija		Hrom. 2: 136608646	Hrom. 15: 28365618	Hrom. 5: 33951693	Hrom. 15: 48426484
Mok 9B	237	GG	AA		AA
Mok 12	122E	GG	GG	GG	
Mok 13	122S	GG	AA	GG	AA
Mok 14	161	GG	AA		AA
Mok 15	163	GG	GG	GG	AA
Mok 16a	181	AA	GG	CC	
Mok 17a	186				AA
Mok 18a	211		AA		
Mok 19a	220	GG	GG	GG	AA
Mok 20	223	GG			
Mok 21a	224		AA	GG	
Mok 22	225		GG		
Mok 23	228		AA	GG	AA
Mok 24a	243	GG			AA
Mok 25a	246	GG	GG	GG	
Mok 26a	247	GG	GG	GG	AA
Mok 10B	257A	GG	AA		AA
Mok 27	257B	GG	AA	GG	
Mok 28a	260	GG	GG		AA
Mok 29a	282	GG		GG	
Mok 30	287	GG	GG	GG	AA
Mok 31	288		AA	GG	AA
Mok 32	295	GG	AA	GG	AA
Mok 33	302	GG	GG	CC	AA

5. DISKUSIJA

5.1. Biološko srodstvo među individuama u Mokrinu i nasleđivanje statusa

Analize u Mokrinu obuhvatile su 14 starijih individua i desetero dece, od kojih je 20 individua sahranjeno pojedinačno, dve su sahranjene u dvojnog grobu (grob 257), a dve analizirane u trojnom grobu (grob 122). Pored očuvanosti petroznih kostiju, glavni kriterijumi za odabir uzoraka bili su raznovrsnost materijalne kulture i prostorna bliskost grobova mlađih i starijih individua kako bi se detektovale biološke veze, kao i moguće nasleđivanje društvenog statusa. Pod pretpostavkom da porodični odnosi imaju veliki uticaj na organizaciju mnogih nekropola (Keyser-Tracqui et al. 2003; Deguilloux et al. 2014; Amorim et al. 2018; Mittnik et al. 2019), ovakva analiza omogućila je upoznavanje funerarne prakse u drevnom Mokrinu.

Analizom drevne DNK detektovano je 15 individua koje su u različitom stepenu srodstva. Srodne individue su, kao što je i pretpostavljeno prilikom odabira uzorka, sahranjene blizu jedna drugoj sugerišući da je nekropola organizovana oko porodičnih veza (slika 5.1.). Izuzetak je bio samo jedan slučaj u uzorku - veza između majke i sina sahranjenih u grobovima 260 i 228.

Veća porodična stabla, odnosno proširene porodice koje bi činile klanove u našem uzorku na Mokrinu, nisu detektovana. Iako se ne može isključiti mogućnost da korišćeni programi za analizu srodstva nisu bili dovoljno efikasni prilikom detektovanja veza iznad trećeg stepena srodstva na dubini sekvenciranja od $\sim 1X$, pretpostavlja se da rezultat o odsustvu porodičnih klanova jeste pouzdan, uzimajući u obzir činjenicu da su oba korišćena programa (*lcMLkin* i *READ*), testirana i prilagođena analizi genoma sekvenciranim na maloj dubini (Lipatov et al. 2015, Kuhn et al. 2018), kao i da su proširene porodice detektovane na drugim analiziranim nekropolama istim metodama (Amorim et al. 2018; Mittnik et al. 2019). Jedina mogućnost da se u mokrinskoj analizi dobije lažno negativni rezultat klanovske organizacije jeste mala veličina uzorka (24 individue). U svakom slučaju, dobijeni rezultati ne mogu potvrditi hipotezu o horizontalnoj stratifikaciji i podeljenosti nekropole na južni i severni deo na osnovu pripadnosti porodičnim linijama.

Ukoliko se socijalni status u drevnoj zajednici prenosio sa generacije na generaciju, to bi se, prema očekivanjima, odrazilo na materijalnu kulturu srodnika. Na osnovu prethodnih paleogenetičkih i izotopskih istraživanja iz sličnog praistorijskog perioda (Mittnik et al. 2019; Sjögren et al. 2020), kao i na osnovu antropoloških i arheoloških istraživanja koja su urađena na nekropoli u Mokrinu (O'Shea 1996, Stefanović 2008; Porčić and Stefanović 2009), postavljena je hipoteza da se socijalni status prenosio preko očeva, dok su žene svoj status sticale preko braka. Dosadašnja saznanja pokazala su da su proširene porodice, praksa ženske egzogamije i patrilinearnost karakterisali rano bronzano doba, te se smatra da su predstavljali strategiju za formiranje saveza sa susednim grupama (Bertemes and Heyd 2015). Iako razlike u statusu kod društva sahranjenog na Mokrinu nisu bile naročito izražene (O'Shea 1996, Stefanović 2008), velika varijabilnost u grobnim priložima omogućava da se razlikuju prestižni i jednostavno opremljeni grobovi (Slika 6.1.).

S obzirom na to da su uzorci sa Mokrina sekvencirani na maloj dubini, koeficijenti srodstva nisu bili dovoljni za donošenje potpuno pouzdanih zaključaka o biološkim vezama između individua, sama analiza morala je uzeti u obzir i mitohondrijske i Y haplogrupe, kao i starost individua u trenutku smrti. Genetički podaci detektovali su tri roditeljske veze u uzorku. Prva roditeljska veza je između starije žene iz dvojnog groba (257A) i 20–35 godina starog muškarca iz susednog groba 243. Kao što je i pretpostavljeno pre analiza, dečak (257B), pored koga je nađen pehar, je u drugostepenoj vezi sa starijom ženom 257A iz istog groba, ali i sa individuum iz groba 243. Ovo je ujedno i jedini slučaj u uzorku gde su tri individue u srodstvu. Normalizovani koeficijenti srodstva izračunati programom *lcMlkin* između individua 257B i 243, i 257B i 257A iznose 0.6, 0.35 i 0.05 (Prilog 2). U prvom mogućem scenariju, individua 257A je majka individue 243, dok bi dečak 257B, koji je podjednako u srodstvu sa obe individue, bio unuk individue 257A i sestrić (bratanac) individue 243. Međutim, dobijeni podaci se razlikuju od teorijskih stepena srodstva za ovakvu vezu, gde bi koeficijenti trebalo da iznose 0.5, 0.5 i 0. S obzirom da koeficijenti za rođačku vezu iznose 0.75, 0.25 i 0, posmatrane vrednosti su smeštene između vrednosti za drugi i treći stepen srodstva - i mogu označavati duple prve rođake (0.5625, 0.375, 0.0625). Ovo je situacija do koje dolazi ukoliko braća ili sestre jedne porodice stupe u bračne odnose sa braćom ili sestrama druge porodice, a njihova deca koja imaju iste bake i deke postaju dupli prvi rođaci.

Ovakav slučaj srodstva je redak u savremenim društvima, ali nije toliko neobičan u pređašnjim, pogotovo manjim populacijama. U drugom scenariju, mlađi čovek 243 bi bio otac starije žene 257A, a ona tetka dečaka 257B. Međutim, kada se uzme u obzir da individue 257A i 243 imaju haplogrupu H, veća je verovatnoća da je prvi scenario tačan. Dečakove mt-haplogrupa (K1a4) i Y-haplogrupa (R1b1a2a2c1a1) dodatno komplikuju situaciju, jer se razlikuju od haplogrupa muškaraca u grobu 243 (H i BT). Stoga, iako je prva pretpostavka razumljiva, izgleda da ova veza može biti dalja i komplikovanija. Dečak 257B je definitivno u srodstvu sa obe individue što pokazuju i *lcMLkin*, *READ* i *f3* statistika, ali s obzirom na rezultate Y haplogrupe, kao i mtDNK, najbolje je reći da su veoma blisko srodni, negde između drugog i trećeg stepena sa mogućim komplikovanim inbridingom. Kada je Y haplogrupa posmatrana drugom metodom (*yleaf*), haplogrupa muškarca u grobu 243 bila je ista kao i dečakova (R1b), pa je moguće da je dečak bratanac individue 243, a unuk 257A.

Iako ni dečak ni starija žena iz dvojnog groba nisu posedovali nijedan marker visokog statusa, grob muškarca 243 opremljen je kamenom sekirom koja sugerise viši status, ali i da taj status nije mogao biti nasleđen preko majke. Dakle, ovaj muškarac je status nasledio preko oca ili ga je stekao svojim umećem tokom života.

Genetičkim podacima detektovane su još dve roditeljske veze. Žena iz groba 228, sahranjena sa pojaskom niskom i peharom, majka je mladog muškarca (15–18 godina) iz groba 260 koji je sahranjen bez grobnih priloga. Do ovog rezultata se došlo na osnovu zajedničke haplogrupe mtDNK – J1c. Iako je majka stekla ili nasledila visoko statusne markere, izvesno je da nije prenela svoj status na sina.

Treći primer roditeljske veze detektovan je između individua sahranjenih sa visoko statusnim markerima - odraslog muškarca iz groba 163, sahranjenog sa kamenom sekirom i jednostavnim keramikom, i odrasle žene iz groba 181, sahranjene sa ogrlicom napravljenom od *Dentalium* školjki i bronzanih perli, i peharom. Sudeći po mitohondrijskoj haplogrupi (oboje imaju U4a2), žena je najverovatnije majka muškarca u grobu 163. Budući da su obe individue sahranjene sa grobnim prilozima, indikatorima visokog socijalnog statusa, a da je muškarac već odrasla osoba u trenutku svoje smrti, nemoguće je zaključiti da li je on svoj status stekao ili nasledio.

Nasuprot prethodnom slučaju grupnog groba, genetička veza između dečaka 122E i žene 122S iz trojnog groba nije detektovana, što je iznenađujući rezultat s obzirom da

su grupni grobovi često porodične grobnice (Haak et al. 2008). Međutim, dečak 122E je imao brata, odraslog muškarca sahranjenog u grobu 211 sa bodežem i keramičkom činijom. Takve rezultate podržavaju i njihove haplogrupe, kao i prostorna bliskost grobova. Ovo je ujedno i jedini slučaj gde je dečak imao vrednije grobne priloge: koštanu iglu, ogrlicu napravljenu od kaolina i koštanih perli i bronzanu mindušu, iako se u ovakav zaključak može sumnjati s obzirom na to da grobni prilozima potiču iz grupnog groba, te postoji mogućnost greške u prisvajanju artefakta. Zbog loše očuvanosti, treća individua iz trojnog groba (122W) nije mogla biti analizirana, što ostavlja mogućnost potencijalne porodične veze u grupnom grobu i dalje otvorenom. Prethodna istraživanja su pokazala da je funerarna praksa moriške kulture dovoljno stroga da se pretpostavi da su grupni grobovi izuzetak i da verovatno nisu rezultat slučajnosti (O'Shea 1996), te je vrlo verovatno da su sve tri individue preminule u slično vreme ili usled neobičnih okolnosti, a iz praktičnih i ekonomskih razloga su sahranjene zajedno. Podatak da individue sahranjene u trojnom grobu nisu genetički povezane sugerise da pozicija na groblju nije uslovljena samo genetičkim vezama, već i drugim faktorima poput socijalnih veza, vremena smrti, a možda i pripadnosti određenoj socijalnoj grupi. Yaka i saradnici (2021) ističu socijalno srodstvo kao veoma važan faktor u formiranju kuća i nekropola i određivanju socijalne organizacije, pogotovo u kasnijem neolitu u centralnoj Anadoliji. Koliko su socijalne veze bile važne i cenjene u formiranju strukture društva svedoči i zajedničko sahranjivanje biološki nesrodnih pojedinaca čak i u slučaju nasilne smrti (Haak et al. 2008; Schroeder et al. 2019).

Druge opservacije na Mokrinu takođe ne pružaju podršku hipotezi da se socijalni status mogao prenositi na muškarce. Drevnom DNK detektovana je veza sestre i brata: 9–11 godina stara devojčica iz groba 161 imala je 15–20 godina starog brata sahranjenog u grobu 295. Obe individue imaju mt-haplogrupu H80, a sahranjene su sa različitim statusnim simbolima. Dok je devojčica pokraj sebe imala markere visokog socijalnog statusa (ogrlicu, bronzani ukras za glavu, koštanu iglu i bronzani prsten), grob njenog brata sadržao je samo malu i jednostavnu keramiku. Treba napomenuti da je devojčica najverovatnije premlada da ovaj status stekne udajom, ali ga je mogla naslediti kao deo svog miraza. Činjenica da brat i sestra pokazuju različiti status u grobu saglasna je sa sistemom u kome žene, ali ne i muškarci, mogu naslediti socijalni status.

Pored individua sahranjenih u grobovima 163 i 181, samo su u još jednom slučaju

srodnici pokazali sličan socijalni status kroz grobne priloge. Dva muškarca u grobovima 220 (15–25 godina star) i 225 (25–35 godina star) u drugom su stepenu srodstva. Tačna priroda ove biološke veze ne može se zaključiti na osnovu postojećih podataka, osim informacije da je ostvarena preko muške linije, jer oba muškarca poseduju istu Y haplogrupu (R1b1a2a2c1). Mlađi muškarac, u grobu 220, sahranjen je u južno-severnoj orijentaciji koja je uobičajna za žene. Oba muškarca sahranjena su bez grobnih priloga, što ide u prilog modelu da su muškarci morali da zasluže status, a nasleđuju samo potencijal da status dostignu.

Ustanovljena je samo jedna rođaćka veza, iznad trećeg stepena srodstva, između starije žene visokog statusa iz groba 288 i mladog muškarca nižeg statusa iz groba 282. Dok je ovaj muškarac sahranjen sa tri keramička artefakta, žena je sahranjena sa dve bakarne narukvice, ogrlice napravljene od *Dentalium* i kaolin perli, dve koštane igle i bikonične činije i pehara. Ovaj podatak još jednom sugerise da mlađi muškarac nije mogao naslediti viši status, čak i kada su drugi članovi porodice imali prestižne pozicije u društvu. Ipak, budući da nisu pronađene nesporne veze otac-sin, ne može se sa sigurnošću odbaciti mogućnost da su u ovom sistemu muška deca mogla naslediti status od očeva.

Za razliku od analiza bronzanodopskog nalazišta u Nemačkoj, gde su detektovana deca sahranjena i sa očevima i majkama (Mittnik et al. 2019), analize srodstva na Mokrinu nisu detektovale vezu između očeva i ćerki (već samo tri majke i jednu sestru), tj. nije bilo primera uže porodice (majka, otac i dete). Odsustvo ćerki onemogućava donošenje sigurnog zaključka o tome da li su žene nasleđivale ili sticale svoj status.

Devet individua, koje nisu u genetičkoj vezi ni sa jednom drugom individuum iz uzorka (186, 122S, 223, 224, 237, 246, 247, 287, 302), su žene (3 mlađe i 6 odraslih žena). Nije uočena nikakva pravilnost u njihovoj distribuciji na groblju u odnosu na status, jer je među njima bilo i siromašnih i bogatih žena. S obzirom da je sedam od njih sahranjeno blizu individua za koje je neka od rodbinskih veza detektovana, može se zaključiti da nisu bile izolovane, već da je određena socijalna veza mogla postojati. Bračna veza može biti pretpostavljena za dve žene: 1) odrasla žena iz groba 224 sahranjena je odmah do odraslog muškarca iz groba 225, a sudeći po grobnim priložima nijedno od njih nije uživalo visoki status u društvu; 2) mlada žena iz groba 302 sahranjena je blizu muškarca iz groba 163 i njegove majke (181). Svo troje su imali prestižne grobne

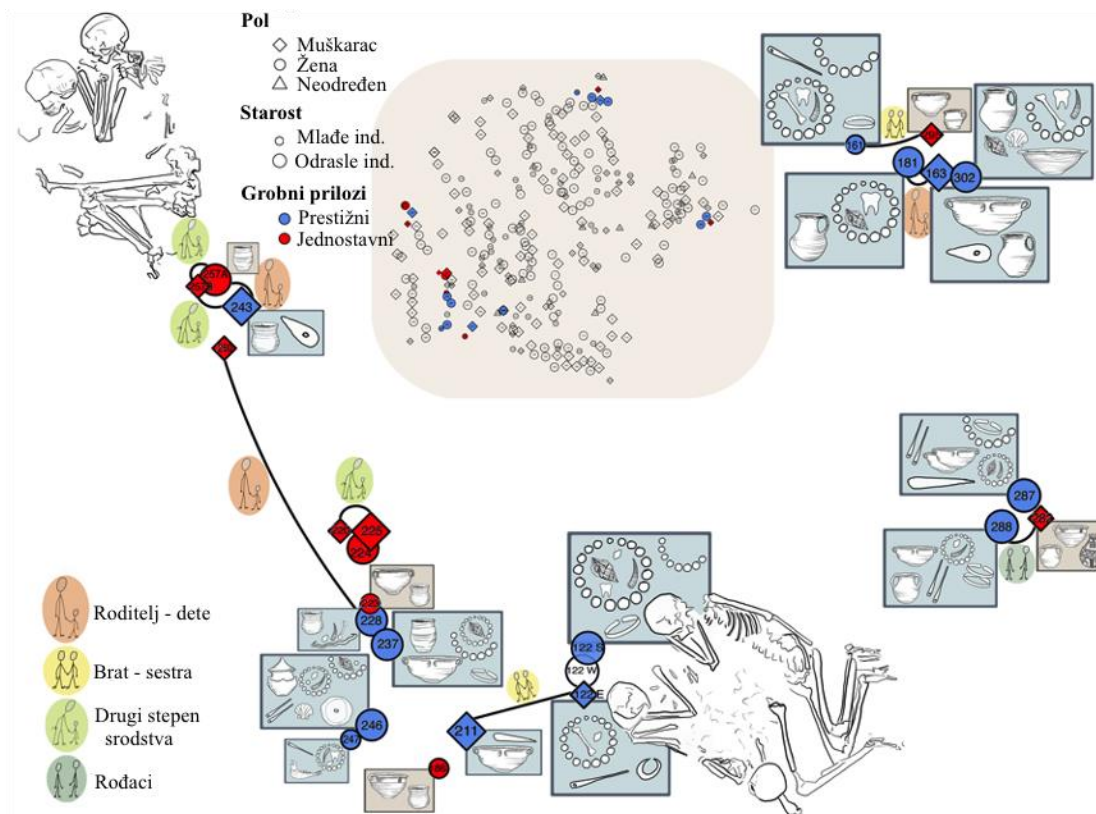
priloge pokraj sebe. Dodatne analize drevne DNK razjasnile bi da li ove individue imaju rođake u trenutno neuzorkovanom delu Mokrina, dok bi analize Sr izotopa dale odgovor da li su ove žene došle u zajednicu iz okolnih mesta, kao što je to bio slučaj na rano-bronzanodopskoj nekropoli u Nemačkoj (Mittnik et al. 2019).

Biološke veze su detektovane za 10 muškaraca u uzorku. Uzimajući u obzir samo srodničke veze prvog stepena, za tri od šest muškaraca zaključuje se da je malo verovatno da su svoj status nasledili (20–25 star mladić u grobu 243, 15–18 star mladić u grobu 260 i 15–20 star mladić u grobu 295) budući da su se njihovi ženski srodnici (majke ili sestra) razlikovali u grobnim priložima. Za muškarce iz grobova 163 (45–55 godina) i 211 (50–55 godina) ne može se jasno odrediti da li su status nasledili ili stekli. Analizirani uzorci ne sadrži očeve sahranjenih muškaraca i jedino što se sa sigurnošću može zaključiti je to da sinovi nisu nasleđivali status od majki.

Bez obzira na malu veličinu uzorka, rezultati su u saglasnosti sa prethodnim istraživanjem u kom se zaključuje da je nasleđivanje višeg statusa blisko vezano za pol individue (Porčić and Stefanović 2009). Sinovi nisu nasleđivali socijalni status od bioloških majki, ali su imali priliku da ga zasluže tokom života kroz neku aktivnost i društveni kvalitet. Ne postoji dovoljno podataka za proveru hipoteze da su sinovi nasleđivali status od očeva, jer nisu pronađene veće porodice, niti supružnici sa drugačijim statusom kroz grobne priloge. Alternativno objašnjenje može podrazumevati da je u Mokrinu važio zakon prvorodenog deteta, a da su u našem uzorku prisutna samo kasnije rođena deca, što nije nekarakteristično za bronzano doba gde su privilegije za prvorodenčad predstavljale strategiju za regulisanje naslednosti i političko-ekonomske organizacije društva (Bertemes and Heyd 2015). Prisustvo grobnih priloga kod nekih dečaka (257B, 122E, 282, 295) može ukazivati na to da su deca koja su bila u srodstvu sa nekim individuama višeg statusa, mogla imati veće mogućnosti i prilike da i oni ostvare viši status. S obzirom na to da su neki članovi društva u Mokrinu bili uključeni u trgovinu na velike razdaljine ili u manje konflikte, ne može se odbaciti mogućnost da su fizički jaki i hrabri muškarci mogli zaslužiti visok društveni status. S druge strane, devojčica koja je sahranjena sa velikim brojem vrednih priloga pokazuje da je status mogao biti nasledan za žene. Takođe, moguće je da su žene dostizale svoj status udajom ili kroz rodbinsku vezu sa prestižnim muškarcem.

Ustanovljeni odnosi u Mokrinu svakako ukazuju na nešto drugačiju društvenu

dinamiku u poređenju sa drugim rano-bronzanodopskim zajednicama, poput onih u Nemačkoj gde je potvrđeno nasleđivanje statusa (Mittnik et al. 2019), ili u kasno-neolitskim društvima, poput kulture zvonastih pehara u Bavariji, u kojima su uočeni signali da su muškarci mogli nasleđivati status (Sjögren et al. 2020).



Slika 5.1. Prostorna distribucija 24 analizirana groba na Mokrinu i prikaz detektovanih rodbinskih veza. Ukrasi za glavu su prikazani polukrugom, ogrlice zatvorenim krugom, a pojasne niske talasastim linijama. Materijal koji je korišćen za izradu nakita je prikazan unutar samog nakita. Plava i crvena boja reflektuju status individua na osnovu njihovih grobnih priloga. Autor slike: Mona Schreiber.

5.2. Bračno prebivalište

U mnogim ljudskim društvima, kako u prošlosti, tako i u savremenoj civilizaciji, određeni nivoi organizacije zasnivaju se na srodstvu i okupljanju oko zajedničkog porekla. Patrilinearna društva zasnivaju se na organizovanju kroz muške linije, dok se matrilinearna okupljaju preko ženskih linija nasleđivanja. Praksa bračnog prebivališta zavisi od kombinacije mnogih faktora koji imaju efekat na preživljavanje ljudi u društvu - sukobi, podele rada, posedovanje pokretnog bogatstva (stoke, novca ili robova) ili jačanje lokalne samouprave (Ember and Ember 1971). Nisu, međutim, sva društva jasno

organizovana, niti su pozicije pojedinaca strogo određene rođenjem i statusom porodice budući da se genetičkim srodstvom ne može objasniti celokupna kooperacija između ljudi u zajednicama (Cronk et al. 2019).

Na osnovu razlika između populacija u varijabilnosti antropološki relevantnih karakteristika ljudi, u arheologiji je moguće donositi zaključke o bračnom prebivalištu i migracijama polova. Na primer, mobilniji pol pokazivaće veću varijabilnost skeletnih i dentalnih osobina unutar jednog arheološkog nalazišta, dok će pol koji se manje kreće ispoljavati veću varijabilnost ovih karakteristika između različitih populacija (Johnson and Paul 2016). Slično tome, mitohondrijske i Y haplogrupe, kroz analize genetičke varijabilnosti unutar i između populacija, istraživanja srodstva i socijalne organizacije praistorijskih društava, mogu voditi zaključku o tome da li je društvo bilo patrilokalno ili matrilokalno.

U uzorku sa Mokrina zapaža se velika varijabilnost mtDNK ($\hat{h} = 0.95$) i prisustvo čak 14 različitih haplogrupa. Šest individua pripada haplogrupi U: jedna grupi U3, dve grupi U4 i tri su nosioci mitohondrija sa genomom iz grupe U5. U4 i U5 haplogrupe su karakteristične za mezolit i lovačko sakupljačka društva u centralnoj i severnoj Evropi pre neolita (Bramanti et al. 2009; Bollongino et al. 2013; Brandt et al. 2013; Fu et al. 2013), a poseduju ih i ljudi iz kasno-neolitskih populacija (Bollongino et al. 2013). Smatra se da je U5 haplogrupa najstarija među njima, nastala još pre oko 30,000 – 42,000 godina (Fu et al. 2013; Brandt et al. 2015). S obzirom na geografsku raširenost i starost ove haplogrupe u Evropi, pretpostavlja se da je postojao genetički kontinuitet po ženskoj liniji od prvog naseljavanja Evrope pa sve do neolita (Fu et al. 2013; Brandt et al. 2015; Sikora et al. 2017). Za razliku od U4 haplogrupe, koja nije pronađena među paleolitskim ljudima u Evropi, haplogrupe U2 i U8 su detektovane i u periodu od pre poslednjeg glacijalnog maksimuma (oko 26-19,000 godina), ali ne i u mezolitu (Fu et al. 2013). Opreznost u tumačenju ovih podataka nameće se zbog malobrojnih uzoraka iz paleolita, kao i zbog genetičkih efekata intenzivnih prolazaka evropskih populacija kroz uska grla usled dramatičnih promena klime, i kasnijih ponovnih naseljavanja. U4 i U5 haplogrupe nisu detektovane u populacijama ranog neolita za razliku od mitohondrijskog genskog pula lovačko sakupljačkih društava (Bramanti et al. 2009; Haak et al. 2010). Haplogrupa U danas je druga po učestalosti u Evropi, odmah iza haplogrupe H. U današnjim populacijama U3 je ređa od U4 i U5 haplogrupa i prisutnija je na Bliskom istoku nego u

ostatku Evrope (Haak et al. 2010).

Deset individua sa Mokrina sadrži grupu H mitohondrijskog genoma, koja je i najzastupljenija mtDNK haplogrupa (~40%) u Evropi među savremenim populacijama (Brandt et al. 2013). Kod lovaca sakupljača u centralnoj Evropi i Skandinaviji ova haplogrupa nije prisutna, ali je ustanovljena u populacijama lovaca sakupljača na Iberijskom poluostrvu, a njena se distribucija menjala tokom neolita (Brandt et al. 2013; 2015). Smatra se da je H grupa stigla u Evropu sa Bliskog istoka zajedno sa R0 i HV0 pre oko 22,000 godina (Brotherton et al. 2013). Dve individue iz Mokrina su nosioci mitohondrijskog genoma H1 podgrupe, koja se iz zapadnog refugijuma raširila po Evropi u holocenu, pre oko 12,000 godina (Brandt et al. 2015).

Haplogrupi J1 (J1b1a1 i J1c) pripadaju četiri individue sa Mokrina, dok tri individue sadrže haplogrupu T2b. J i T haplogrupe odvojile su se od JT haplogrupe čija se starost procenjuje na oko 58,000 godina. Upravo J i T haplogrupe smatraju se markerima širenja neolita u Evropu sa Bliskog istoka (Pala et al. 2012). Od haplogrupe J definisale su se dve glavne grane pre oko 33,000 godina: J1 (J1b, J1d i J1c) i J2 (Pala et al. 2012). Konkretno, subklada J1b1a je karakteristična za Evropu i datira od pre ~14,000 godina, dok je J1c stara oko ~16,000 godina. Dominantna je u centralnoj Evropi, Balkanu i Ukrajni, a pronađena je i među neolitskim ostacima iz zapadne Evrope (Pala et al. 2012).

Od haplogrupe T razdvojile su se dve podgrupe, T1 i T2, pre oko 21,000 godina. T2b predstavlja najčešću subkladu T2 haplogrupe, a raširila se migracijom tokom ranog neolita pre oko 10,000 godina (Pala et al. 2012). Dominantna je u Evropi i identifikovana je kod nekoliko neolitskih skeletnih ostataka iz zapadne Evrope.

Samo jedna individua iz Mokrina ima K1 grupu (K1a4), koja se danas može detektovati na Bliskom istoku, Anadoliji, ali i u celoj Evropi. Starost K1a haplogrupe procenjena je na oko 19-22,000 godina, nije pronađena u ostacima iz mezolita, karakteristična je za rane zemljoradničko-stočarske zajednice i veoma je zastupljena i u Evropi i na Bliskom istoku (Mathieson et al. 2015; Lazaridis et al. 2016).

U uzorku sa Mokrina prisutno je pet haplogrupa Y hromozoma među deset muških individua. Četiri muškarca nosilo je I2a haplogrupu koja se širila nakon poslednjeg glacijalnog maksimuma iz jadranskog refugijuma i karakteristična je za evropske lovce sakupljače. Haplogrupa I je nešto ređa kod zemljoradničko-stočarskih zajednica (Lazaridis et al. 2016), ali odlikuje i ljude u bronzanom dobu (Allentoft et al.

2015; Haak et al. 2015; Mathieson et al. 2015). Danas je prisutna u Evropi sa najvećom učestalošću kod Skandinavaca i južnoistočnih Evropljana (Lazaridis et al. 2014; Brandt et al. 2015).

Haplogrupa J, koja je sestrinska grupi I, pronađena je u jednom muškom ostatku (J2b) sa Mokrina. Ova haplogrupa bila je prisutna kod lovaca sakupljača sa Kavkaza i kod dve individue ranih zemljoradnika iz Anadolije, a njena učestalost raste tokom bronzanog doba u centralnoj i zapadnoj Evropi (Allentoft et al. 2015; Haak et al. 2015; Mathieson et al. 2015; Lazaridis et al. 2016).

Tri muška skeleta sadržala su R1b haplogrupu koja je česta u savremenim populacijama zapadne Evrope. Ova haplogrupa karakteristična je i za kulturu zvonastih pehara i asocirana je sa dolaskom migranata iz stepa u centralnu Evropu oko 3,000 godine pre nove ere, dok je kao i R1a odsutna kod ranih zemljoradničko-stočarskih zajednica (Allentoft et al. 2015; Haak et al. 2015; Brandt et al. 2015; Mathieson et al. 2015; Olalde et al. 2018). U uzorku nije detektovana R1a1a haplogrupa, karakteristična za južnoistočnu Evropu, kasnoneolitsku kulturu vrpčaste keramike i drevne populacije iz stepa istočne Evrope (Brandt et al. 2013).

Kod dve muške individue (243 i 282) pronađena je jedna od najstarijih haplogrupa (BT) (Cruciani et al. 2011), kako je procenjeno programom *yhaplo*. Nasuprot tome, program *yleaf* procenio je da se zapravo radi o haplotipovima R1b1a1b1b3a1a i I2a1a1b1.

Na osnovu prikazanih genetičkih podataka nije moguće sa sigurnošću zaključiti kakvo je bilo bračno prebivalište u Mokrinu. Ipak, u prilog praksi ženske egzogamije sa drugim naseljima govore visoka varijabilnost mtDNK, odsustvo ćerki u uzorku, kao i prisustvo žena različitog statusa koje nisu bile u biološkom srodstvu sa muškarcima. Takav zaključak sličan je studiji sa rano-bronzanodopskog nalazišta u južnoj Nemačkoj, gde je ustanovljeno i odsustvo odraslih ćerki i prisustvo žena visokog statusa za koje nije utvrđeno srodstvo (Mittnik et al. 2019). Mora se, međutim, imati u vidu da uzorkovanje ograničenog broja ostataka iz Mokrina može biti razlog zbog kog nisu detektovane ćerke ili srodnici devet ženskih individua.

Na osnovu rezultata svih analiza, sigurno je da se može odbaciti matrilokalnost drevnog društva u Mokrinu, ali se ne može zaključiti da li je društvo u Mokrinu bilo strogo patrilinearno ili patrilokalno. Podaci o nekropoli koje je koristila nestrukturirana populacija, u kojoj nisu detektovane veće grupe ili porodice i u kojoj postoji visoka

varijabilnost Y haplotipova, takođe ne podržavaju hipotezu o strogoj patrilokalnosti. Ovoj hipotezi ne doprinosi ni činjenica da nisu pronađeni očevi u analiziranom uzorku.

Patrilinarnost je često povezana sa ženskom egzogamijom, tj. praksom u kojoj se žene udaju izvan svoje socijalne grupe, a nasuprot endogamiji kojom se označava brak unutar populacije ili zajednice. Moguće je da je dolazak žena iz drugih naselja u jednu zajednicu predstavljao adaptaciju za vreme kasnog neolita kada su migracije grupa muškaraca bile česte usled brojnih sukoba (Kristiansen et al. 2017). Biološki i socijalni faktori podstiču bračne veze između različitih grupa, ukoliko one nisu izolovane geografskim ili kulturnim mehanizmima. Protok gena, koji je posledica migracija, dovodi do smanjene diferencijacije između populacija ili nastanka jedne, genetički heterogene populacije. Iako je mobilnost bila neophodna za distribuciju metala i novih tehnologija za vreme bronzanog doba u Evropi i Aziji, masovne migracije nisu bile jedini izvor ideja i kulturnih inovacija, već su i kretanja pojedinaca, karakteristična za određeni pol ili godine, imala ogroman uticaj. Drugim rečima, egzogamija je predstavljala važan faktor za širenje ideja i novina (Knipper et al. 2017).

Jedna od malobrojnih studija socijalne organizacije u ranoj praistoriji, sa arheološkog nalazišta Sungir iz kasnog paleolita (pre oko 34-33,000 godina) u zapadnoj Rusiji, pokazala je da među lovcima sakupljačima ukrštanje između srodnika nije bilo favorizovano, već su bile česte egzogamija i mešanja između dema. Takva socijalna dinamika mogla je doprinosti poboljšanju kooperacije između lokalnih grupa (Sikora et al. 2017). Egzogamija je, na osnovu analiza izotopa stroncijuma, dokazana i u centralnoj i zapadnoj Evropi u kasnom neolitu i ranom bronzanom dobu (Haak et al. 2008; Knipper et al. 2017; Mittnik et al. 2019; Schroeder et al. 2019; Sjögren et al. 2020; Furtwängler et al. 2020), ali i u skorijem periodu, u ranom srednjem veku (Veeramah et al. 2018).

Patrilokalnost je očigledno bila dominantna forma bračnog prebivanja u zajednicama kasnog neolita u centralnoj Evropi i ogleđa se u veoma niskom diverzitetu Y haplotipova i visokoj varijabilnosti mtDNK (Sanchez-Quinto et al. 2019; Mittnik et al. 2019; Schroeder et al. 2019; Sjögren et al. 2020; Furtwängler et al. 2020), dok je matrilokalnost tek ponegde zabeležena (Kennett et al. 2017). Ovakav sistem takođe se vezuje i za kulturu vrpčaste keramike i donošenje genetičke komponente iz stepa u Evropu. Smatra se da život u kom su članovi zajednice veoma mobilni, često podrazumeva puno konflikata sa drugim lokalnim zajednicama, a stoga i mušku

agresivnost i patrilokalnost (Haak et al. 2015; Allentoft et al. 2015). Poznavanje populacione dinamike neophodno je za potpuno razumevanje genetičke varijabilnosti populacija, njihovog mešanja i donošenja antropoloških zaključaka. Na primer, određena haplogrupa može biti česta u datom trenutku i prostoru zbog prethodne istorije migracija ili prolaska populacije kroz usko grlo, odnosno ne mora nužno reflektovati specifičnu socijalnu organizaciju i patrilokalnost (Sjögren et al. 2020).

U Mokrinu je detektovan visok diverzitet mitohondrijskih i Y haplogrupa, više različitih linija i manjih porodica, pa se može pretpostaviti da je ovu nekropolu koristilo više zajednica moriške kulture koje su međusobno sarađivale. Takav zaključak podržava hipotezu da je društvo u Mokrinu bilo malo naselje koje je uspevalo da opstane kroz uspostavljanje rodbinskih veza i zajedničkih socijalnih i ekonomskih aktivnosti (Harding 2000). Ukoliko je Mokrin zaista bio zajednička nekropola, verovatno je da ni jedna analiza ne može sa sigurnošću ustanoviti da li je društvo bilo matrilokalno ili patrilokalno.

5.3. Rekonstrukcija socijalne organizacije u Mokrinu

Morišku zajednicu, nasuprot očekivanjima, ne odlikuje tipičan rangirani sistem, iako su utvrđena neka pravila u nasleđivanju bogatstva. Dosadašnja istraživanja ukazuju da pripadnici društva na Mokrinu nisu bili jednaki prema statusu i moći – individue su sahranjene sa različitim grobnim priložima i određena podela rada je postojala; dok su neki pojedinci obavljali teške fizičke poslove, drugi su bili pošteđeni napornog rada (O’Shea 1996; Porčić and Stefanović 2009). Premda je društvo bilo donekle rangirano, genetički podaci, slična funerarna praksa i odsustvo dokaza o postojanju monumentalnih građevina, ne pružaju dokaze da je društvo u Mokrinu bilo poglavarstvo koje je karakteristično za bronzano doba. Društveni status mogao je biti donekle nasledan i označen grobnim priložima, markerima visokog društvenog statusa (O’Shea 1996; Stefanović 2008; Porčić and Stefanović 2009). Moguće je da je društveni status žena bio posledica određenih socijalnih veza, dok su muškarci status morali da zasluže, pa je komponenta fizičke aktivnosti bila važna za sticanje i održavanje društvenog položaja. Sve ovo ukazuje na transegalitarno društvo kakva su bila društva na prelazu ka rangiranim društvima. Pristup prestižnim pozicijama je nejednak, ali broj tih pozicija nije stalan, one su često zaslužene i zasnovane na velikodušnosti, a vođe imaju socijalnu moć i teže da oko sebe prikupe pristalice (Ames 2007).

Za razliku od društva u Mokrinu, na salašima u južnoj Nemačkoj jasno je uočena socijalna nejednakost. Nekropole u ovoj regiji odlikuju veće porodice i jasna podeljenost na dva dela: jedan gde su sahranjene visoko statusne i srodne individue sa lepše uređenim grobovima, i drugi deo gde su sahranjene nesrodne individue nižeg statusa (Mittnik et al. 2019). Sličan sistem društva uspostavljen je i u ranom srednjem veku (5-7 vek), što je zaključeno na osnovu analiza na dve nekropole Longobarda u severnoj Italiji i Mađarskoj (Amorim et al. 2018). Izražene socijalne promene se detektuju i u društvima van Evrope, kod kasno-neolitske Lungšan kulture u Kini (2,275–1,844 godine p.n.e), koje se ogledaju u promenama u obrascu sahranjivanja (nekropole su manje i nema velikih grupnih grobova), distribuciji kuća, u ishrani, i promenama sistema - od egalitarnog do stratifikovanog društva u kom je socijalna i politička hijerarhija izraženija (Ning et al. 2021).

5.4. Genetička varijabilnost i struktura populacije sa Mokrina

Mali koeficijent inbridinga, ravnomerna raspoređenost genotipova na *PCA* plotu i veliki diverzitet haplogrupa pokazuju da populacija sahranjena na Mokrinu ne predstavlja izolovanu i genetički strukturiranu populaciju. Ovo ne isključuje postojanje socijalne hijerarhije u društvu, ali sugerise da u populaciji nije došlo ni do strogih geografskih, niti socio-kulturnih barijera u sklapanju brakova između socijalnih grupa.

Kada se posmatra *PCA* plot i varijacije obuhvaćene sa prve dve glavne komponente, PC1 (57% varijanse) i PC2 (38% varijanse), uzorci sa Mokrina ne izlaze iz opsega genetičke varijabilnosti savremenih populacija u Evropi i homogeno su raspoređeni na referentnom panelu modernih uzoraka. Individue sa Mokrina se lokalizuju i vizualizuju unutar evropske genetičke varijabilnosti, kao što je i pretpostavljeno na osnovu prethodnih uzoraka iz bronzanog doba, reflektujući genetičku heterogenost u Evropi u ovom periodu. Na plotu se uočava samo jedan klaster, odnosno sve mokrinske individue se grupišu zajedno i duž obe PC komponente između severnih, istočnih i južnih Evropljana (Italije), a najviše oko centralno/istočnih Evropljana - u sredini Bugarske, Rumunije, Mađarske, Nemačke i Francuske. Dominantno neolitsko (ili mezolitsko) poreklo uslovalo bi da uzorci sa Mokrina odstupaju od ove varijabilnosti i bili bi smešteni bliže savremenim uzorcima sa Sardinije usled njihove genetičke sličnosti sa ranim zemljoradničko-stočarskim zajednicama i geografske izolacije u Evropi. U slučaju

dominantnog lovačko sakupljačkog porekla, analizirani mokrinski uzorci bili bi smešteni najbliže ljudima iz istočnog Baltika.

PCA i *ADMIXTURE* pre svega imaju ulogu u vizuelizaciji genetičke strukture, dok *qpAdm* testira različite modele mešanja između populacija i procenjuje proporcije mešanja. Drugim rečima, ova metoda kvantifikuje procenat porekla. Poput *PCA* grafika, *ADMIXTURE* analiza nije pokazala odstupanje od očekivanih proporcija porekla karakterističnog za bronzano doba, a u odnosu na prethodna istraživanja (Lazaridis et al. 2014; Allentoft et al. 2015). Mali procenat lovačko sakupljačkog porekla je očekivan, s obzirom na to da se njegov uticaj vremenom smanjivao i odsutan je kod rano-neolitskih zemljoradničko-stočarskih zajednica, ali je ustanovljeno da se povećava u populacijama srednjeg i kasnog neolita pružajući dokaze da je dolazilo do mešanja zemljoradničko-stočarskih zajednica i zapadnih lovaca sakupljača (Haak et al. 2010). Kod kasno neolitskih populacija dosta lovačko sakupljačkog porekla bilo je zamenjeno poreklom iz istočnih stepa oko 3,000 godine p.n.e., a koje danas najviše oslikava populacije severne Evrope (Haak et al. 2015; Hoffmanová et al. 2016).

f_3 statistika je korišćena, pored detektovanja srodničkih veza između ljudi Mokrina, i za analizu sličnosti sa drugim populacijama i relacije sa druge dve drevne populacije. Najveća genetička sličnost populacije iz Mokrina uočena je sa određenim neolitskim uzorcima sa teritorije današnje Mađarske, Iberijskog poluostrva i Ukrajine (I1889, I2978, I1899, I1972, I5892), kao i sa ranim kulturama bakarnog doba sa prostora današnje Ukrajine, Mađarske, Španije i Hrvatske (I2110, I1303, I2395, I2785, I2792). Najmanja genetička sličnost, kako se i očekivalo, pronađena je u odnosu na udaljene i geografski izolovane populacije sa Krita, iz Izraela, lovaca sakupljača iz Švedske, i nešto starije datovanih rano-neolitskih populacija sa Iberijskog poluostrva (pre oko 9,000-7,000 godina).

Očekivalo se, takođe, da će uzorci sa Mokrina pokazati veću genetičku sličnost sa nalazima iz kasnog bronzanog doba sa teritorije današnje Crne Gore (RISE595.SG i RISE596.SG), uzorkom moriške kulture iz istog perioda (RISE371.SG), ili sa dva uzorka moriške kulture 200 godina kasnije (RISE373.SG, RISE374.SG) sa teritorije Mađarske (Allentoft et al. 2015). Ovakav rezultat može se objasniti velikom mobilnošću ljudi u ovom periodu, pa samim tim i raznovrsnim genetičkim uticajima pod kojima se nalazila populacija u Mokrinu. Takođe, rezultati sugerišu da *outgroup* f_3 statistika nije dovoljno

dobra metoda za jasno stratifikovanje varijabilnosti u Evropi u bronzanom dobu jer se intenzivno mešanje ljudi već dogodilo.

Za sada ne postoje podaci o nastanku moriške kulture. Pretpostavlja se da je moriška kultura formirana nakon nestanka kultura kasnog bakarnog doba, ali još uvek je nepoznato da li je na ovom prostoru došlo do kontakta između kulture bakarnog doba i novopridošlih populacija (Stefanović 2008). S obzirom na veliku heterogenost antropoloških podataka, kao i na susrete i mešanje mnogih populacija u prošlosti, pretpostavlja se da je to mogao biti slučaj (Stefanović 2008).

Određene sličnosti materijalne kulture i karakteristika nekropole i sahranjivanja ukazuju na jaku vezu između populacija regije Moriša i Tise sa kulturama u Austriji i Bavariji (Endrődi and Pásztor 2006; Bertemes and Heyd 2015). Na primer, specifični tip keramike sa utisnutim koncentričnim krugovima, karakterističan je za *Csepel* grupu kulture zvonastih pehara, a uočen je i u ranim fazama *Nagyrev* i moriške kulture (Endrődi and Pásztor 2006). Zlatne pločice su takođe zajedničke za kulturu zvonastih pehara iz Mađarske, Óbéba i Mokrin (Endrődi and Pásztor 2006). Ove sličnosti mogu biti posledica trgovačkih veza između rano-bronzanodopskih kultura u Dunavskoj regiji, koje je odlikovao odličan strateški položaj u blizini bakarne rude i koji je omogućio aktivnu razmenu materijala i ideja sa moriškom populacijom (Endrődi and Pásztor 2006; Bertemes and Heyd 2015). Karakteristike populacija u Austriji i Bavariji jesu nove nekropole koje mogu biti korišćene i po nekoliko vekova (kao i Mokrin), tipičan način sahranjivanja u odnosu na pol, određen tip keramike, kao i specifični ukrasni nakit za telo i odeću, koji više nije uniforman, već varijabilan i češći (Bertemes and Heyd 2015). Nove nekropole ukazuju na nepostojanje kontinuiteta groblja između kasnog bakarnog perioda i ranog bronzanog doba, kao i da se jedno društvo polako usložnjavalo (Bertemes and Heyd 2015). Dakle, Mokrin je u svojoj inicijalnoj fazi veoma sličan nekropolama u današnjoj Austriji, a pokazuje i sličnost sa populacijom zvonastih pehara. S obzirom, da ne postoje groblja sličnih karakteristika *Nagyrev* grupe, predložena je i hipoteza da su dunavske *Leitha* ili *Unterwölbling* populacije u Austriji migrirale južno i nastanile na području reke Moriš oko 2,200 godine p.n.e. Druga mogućnost je da su grupe koje su migrirale bile deo veće kulture zvonastih pehara čija su naselja ubrzo postala deo *Nagyrev* grupe (Bertemes and Heyd 2015). Razlozi migracije nisu poznati, ali one su svakako bile

uslovljene ekonomskim faktorima, društvenom organizacijom i načinom života, te je do njih došlo verovatno usled rasta populacije, demografskog pritiska i nedostatka resursa.

Oko 1,500 godine p.n.e. moriška kultura nestaje iz nepoznatog razloga, ali moguće je da se razlozi mogu pronaći u učestalim migracijama i češćim konfliktima (O'Shea 1996), ili u poplavama, s obzirom na položaj pokraj reka i činjenice da ovaj predeo kasnije nije nastanjen drugim populacijama (Stefanović 2006).

U genetičkom kontekstu, zapaža se trend porasta genetičkog diverziteta mtDNK; na primer, dva puta je manji kod ranih zemljoradničko-stočarskih zajednica (T2, K, J, HV, i V) nego kod današnjih Evropljana (Fu et al. 2013) kod kojih su najčešće haplogrupe K, H, HV, V, J, T i U2-U5 (Brandt et al. 2015). Sa dolaskom Jamne kulture, dešavaju se promene u učestalostima određenih haplogrupa mtDNK (Jamnu kulturu karakterišu haplogrupe I, T1, U2, U4, U5a, W i H), ali i haplogrupa na Y hromozomu, što potvrđuje da su oba pola učestvovala u migracijama, iako su muškarci bili dominantni (Haak et al. 2010; Brandt et al. 2013; Szécsényi-Nagy et al. 2015; Haak et al. 2015; Allentoft et al. 2015). Bronzano doba u Evropi odlikuju haplogrupe I, U2, T1, U4, i U5a, kao i haplogrupe tipične za rane zemljoradničko-stočarske zajednice, što sugeriše da su obe kulture učestvovala po majčinoj liniji u tranziciji od neolita ka bronzanom dobu (Brandt et al. 2013).

5.5. Inbriding

Ukrštanje individua koje su u većem stepenu srodstva od prosečnog para u populaciji označava se kao inbriding, a procenjuje se koeficijentom inbridinga f . U slučaju ukrštanja između polubrata i polusestre (ili npr. između ujaka i sestričine), prvim, drugim ili trećim rođacima, f bi iznosio 0.125, 0.0625, 0.0156 i 0.0039, redom (Ceballos et al. 2018). Efekat inbridinga na nivou populacije ogleda se u smanjenju učestalosti heterozigotnih genotipova i meri se parametrom indeksa fiksacije. Procenjeni koeficijent inbridinga u zajednici Mokrina jednak je nuli. Strukturiranost populacije (tj. postojanje delimično izolovanih lokalnih grupa) uslovljava pad heterozigotnosti u odnosu na očekivanu heterozigotnost kada bi populacija bila panmiksična (Valundov efekat) i meri se pozitivnom indeksom fiksacije. Svi matematički parametri ukazuju da populacija Mokrina nije bila strukturirana.

Još je O'Shea (1996) pretpostavio da tipično moriško selo predstavlja autonomno selo koje se sastojalo od 6-8 domaćinstva različitih po socijalnom statusu, u kojima su pojedini muškarci, umešni u ratovanju ili trgovini sa udaljenim mestima, doprinosili ovoj segregaciji. Iako je razlika u nasleđivanju i ekonomskim mogućnostima postojala, verovatno je da su zajednice bile previše male za formiranje veće socijalne barijere između članova. Raspored i izgled grobova u Mokrinu potvrđuju zaključak da su bogati i siromašni članovi društva delili mesto sahranjivanja i svoje obaveze prema zajednici.

Procenjuje se da čak 10% ljudi na svetu predstavlja potomstvo nastalo iz srodničkog ukrštanja (Bittles and Black 2010). Veća incidenca brakova među rođacima prisutna je u delovima sveta gde kultura i religija to dozvoljavaju (npr. zapadna i južna Azija, među američkim starosedecima i grupama u Amazonu), kao i u društvima u kojima su prisutni specifični socijalno-demografski faktori i veoma izražena pripadnost nekoj grupi (npr. između privilegovanih klasa), ili u društvima sa jasnom socijalnom stratifikacijom, u kojima, iz tog razloga, odsustvuje panmiksija (Ceballos et al. 2018). Takođe, do ukrštanja među rođacima dolazi češće ukoliko je efektivna veličina populacije (N_e) mala, a populacija je izolovana i sklona endogamiji (Ceballos et al. 2018). Studije su pokazale da se učestali inbriding odražava na genetičku strukturu malih osnivačkih populacija i populacija koje su prolazile kroz uska grla usled epidemija, nestašice hrane ili sukoba (Bittles and Black 2010).

Inbriding je detektovan i kod neandertalaca (Prüfer et al. 2014) i kod Denisova individue iz Sibira ukazujući na malu brojnost njihovih populacija (Kuhlwilm et al. 2016). Kod nekih savremenih društava sa izolovanim kulturama (npr. u Amazonu), takođe postoji visok nivo inbridinga (Sikora et al. 2017). Dosadašnje analize pokazuju, međutim, da ukoliko postoji mogućnost egzogamije, čak i u manjim lovačko sakupljačkim društvima (poput Sungir populacije čija je veličina populacije brojala oko 200 individua), ukrštanje u srodstvu neće biti favorizovano (Sikora et al. 2017). Nasuprot endogamnim, zatvorenim zajednicama (Ning et al. 2021), koeficijent inbridinga opada sa otvorenošću zajednica, što je ustanovljeno kod neolitskih zemljoradničko-stočarskih zajednica, a nakon toga i u bronzanom dobu usled čestih migracija. Mešanje među rođacima je svakako bilo dominantno kod kraljevskih i elitnih porodica (Bittles and Black 2010; Cassidy et al. 2020), poput Habzburške dinastije (Alvarez et al. 2009) ili kineske

Han dinastije (Ning et al. 2021), kako bi se održao visok socijalni status i jake političke veze.

5.6. Fenotipski markeri

5.6.1. Pigmentacija

Oba izvedena alela rs1426654*A (*SLC24A5*) i rs16891982*G (*SLC45A2*), asocirana sa depigmentacijom kože, detektovani su kod 15 individua sa Mokrina. Učestalost *SLC24A5* alela na Mokrinu iznosi 1 (0.8899–1). Ovaj alel je fiksiran i kod savremenih Evropljana i bio je pod jakim intenzitetom prirodne selekcije. Učestalost drugog *SLC45A2* alela u populaciji sa Mokrina iznosi 0.7098 (0.5365–0.8476), slično današnjim populacijama u Španiji (0.8178). Iako se i ovaj alel nalazio pod intenzivnom selekcijom kod modernih i drevnih Evropljana, on nije fiksiran u populaciji (učestalost iznosi 0.94), što se moglo očekivati uzimajući u obzir podatak da se povećanje učestalosti ovog alela dešavalo u kasnijem neolitu (Furtwängler et al. 2020). Nedavna studija je pokazala da su aleli *SLC45A2* i *SLC24A5* i izvedeni alel za svetlije oči *HERC2* prisutni i kod individua iz neolita, eneolita i bronzanog doba sa današnjeg područja Hrvatske potvrđujući da se učestalost izvedenog alela *SLC24A5* brzo povećava za vreme neolita zahvaljujući migracijama (Freilich et al. 2022). Trend depigmentacije, tačnije smanjenja pojave crne kose i tamnije puti i povećanja braon kose i nešto svetlije puti, se uočio i kod stanovnika Anadolije, Irana i Levanta za vreme bronzanog doba (Lazaridis et al. 2022).

Kao što je pomenuto, izvedeni G alel na poziciji rs12913832 u *HERC2* genu predstavlja mutaciju asociranu sa depigmentacijom dužice (plave oči). 20 individua sa Mokrina nosila su informaciju za ovaj alel čija je učestalost bila 0.4498 (0.2946–0.6127), slično savremenoj populaciji u Toskani (0.4206; 0.4206 – 0.4415). Plave oči su zapažene još kod mezolitskih ljudi (Olaide et al. 2014), a nasuprot alelu za depigmentaciju kože, postaje manje zastupljen u kasnijem neolitu (Furtwängler et al. 2020). Ovaj marker, kako su studije pokazale, bio je prisutan sa srednjom učestalošću kod Evropljana u bronzanom dobu, dok ga kod Jamne populaciji nije bilo. Velike migracije Jamna ljudi donele su u Evropu gene za svetliju kožu i braon oči (Allentoft et al. 2015). U Britaniji se zapaža porast učestalosti dva alela za depigmentaciju kože i očiju od kraja neolita i početka

bronzanog doba, što se povezuje sa dolaskom kulture zvonastih pehara (Olalde et al. 2018).

Među stanovnicima Mokrina nije detektovan visoko polimorfan alel kod Evropljana *TYR* (rs1042602 C>A) gde je izvedeni A alel asociran sa svetlom bojom kože i očiju (Wilde et al. 2014).

5.6.2. Tolerancija na laktozu

Povećanje učestalosti 13,910*T alela za toleranciju na laktozu dešava se nakon što je mleko uvedeno u ishranu. Pojava laktozne tolerancije u adultnom dobu predstavlja jedan od najznačajnijih primera uticaja kulturne evolucije na biološku evoluciju ljudi. Osobe koje su nosile ovaj alel, a na samom početku ih je moralo biti svega nekoliko, pokazivale su veliku prednost u preživljavanju i reprodukciji kroz mogućnost upotrebe novog nutrijenta u ishrani. Relativno brzo širenje LP alela u populacijama određenih evropskih prostora ukazuje na značajan efekat selekcije pod uticajem određenih ekoloških faktora (klimatski uslovi i količina UV zraka), ali i posledice dinamičnih demografskih promena, poput migracija i rasta populacija (Itan et al. 2009).

Kroz savremene i drevne podatke pokazano je da se ova osobina nalazila pod jakim intenzitetom selekcije kod ljudi. Studije drevne DNK ustanovile su da je ovaj alel bio redak ili odsutan među ranim zemljoradničko-stočarskim zajednicama iz centralne Evrope (Burger et al. 2007), a u skladu sa sporim inicijalnim povećanjem učestalosti ovog alela, niska učestalost je detektovana i u kasnom neolitu (Furtwängler et al. 2020). Mali porast učestalosti (5% - 10%) zapažen je oko 3,000 godina p.n.e, na početku bronzanog doba u Evropi, kada ova osobina postaje vidljiva u populacijama, čak i kada je uzorkovano svega nekoliko ostataka, što ipak pokazuje da je ova genska varijanta favorizovana kasnije nego što je to prvobitno pretpostavljeno (Allentoft et al. 2015; Mathieson et al. 2015; Olalde et al. 2018). Među evropskim ljudima, najvišu učestalost LP alela imale su individue koje su pripadale kulturi vrpčaste keramike i njima srodne bronzanodopske kulture sa prostora Skandinavije, dok je učestalost ovog alela među drevnim grupama bila najviša kod Jamna populacije (oko 25%) (Allentoft et al. 2015). Na osnovu ovih nalaza, Allentoft i saradnici (2015) pretpostavljaju da je mutacija nastala u stepama istočne Evrope odakle se migracijom širila kroz Evropu.

Pređački alel G markera rs4988235 na hromozomu 2 asociran je sa netolerancijom na laktozu, dok je izvedeni alel A u homozigotnom (AA) i heterozigotnom (AG) stanju asociran sa sposobnošću varenja mleka i u odraslom dobu. Populacija sa Mokrina imala je relativno nisku učestalost ovog alela, samo 4.6%. Ljude sa bronzanodopskog arheološkog nalazišta Tolens u severnoj Nemačkoj (14 individua je analizirano), gde se desio najstariji zabeleženi konflikt većih razmera koji se desio 1,200. godine p.n.e., takođe odlikuje niska učestalost od 7.1% LP alela (Burger et al. 2020). Ovaj alel, međutim, nije detektovan u 37 individua poreklom iz istočne Evrope i stepa (Bugarske, Ukrajine i Rusije), datovanih od 4,000 – 2,000 godine p.n.e. (Burger et al. 2020). S obzirom da alel nije prisutan u ovim populacijama, hipoteza da se njegovo poreklo vezuje za evropske stepe ne može biti potvrđena. Drugim rečima, značajan doprinos Jamne populacije genetičkom fondu Evrope nije uslovio veliku promenu u učestalosti ovog alela (Burger et al. 2020). Dodatno, sve analizirane individue sa današnjeg područja Hrvatske iz neolita, eneolita i bronzanog doba nisu bile sposobne da vare laktozu kao odrasle osobe, što je u korelaciji sa rezultatima populacije sa Mokrina da je učestalost LP alela niska u bronzanom dobu (Freilich et al. 2022). Učestalosti alela za ovaj marker u savremenim populacijama iznose: CEU - 0.7374 (0.6825 - 0.7848), GBR - 0.7198 (0.6616 - 0.7705), IBS - 0.4579 (0.4029 - 0.5142) i TSI - 0.089 (0.051 – 0.127). Takođe je relativno niske učestalosti kod savremenih Grka, Turaka i ljudi sa Sardinije kada se uporede sa centralnim i severnim Evropljanima.

Sumarno, sve analize vode zaključku da je mali broj ljudi bio tolerantan na laktozu po završetku bronzanog doba u Evropi. Poređenjem učestalosti LP alela između drevnih i savremenih populacija (1000 CEU genoma koji nisu u srodstvu) iz centralne Evrope uočena je jaka pozitivna selekcija u poslednjih 3,000 godina (160 generacija), $s = 0,06$. Nasuprot starijim uzorcima, mlađi uzorci iz Letonije (2680 - 2510 BP, $N = 8,57\%$) (Mittnik et al. 2018) i srednjovekovni uzorci iz južne Nemačke i Mađarske imaju visoku učestalost LP alela (70%).

Povećani selekcionni koeficijent za rs4988235*T alel od bronzanog doba do srednjeg veka može biti povezan sa poboljšanjem imuniteta i pojavom patogena (Sverrisdottir et al. 2014; Walker and Thomas 2019). U isto vreme zapažena je i jaka selekcija za alel rs7570971*C na istom haplotipu, koji ima ulogu u redukciji holesterola (Zhang et al. 2013), kao i za izvedeni alel rs5743810 ($s = 1.8\%$), lociran u regionu genoma

za receptore slične Tollu (engl. *toll-like receptors - TLR*), značajnom komponentom urođenog imunskog sistema (Burger et al. 2020). Ovi receptori su specifični za različite komponente mikroorganizama i imaju ulogu u prepoznavanju patogena i aktivaciji signalnih puteva koji stimulišu ekspresiju gena koji kodiraju za proteine uključene u proces inflamacije i otpornost na virusne i bakterijske infekcije (Abbas and Lichtman 2008). Veliko povećanje učestalosti svih ovih alela za relativno kratko vreme (oko 3,000 godina) nameće postavku da je jaka selekcija za laktoznu toleranciju delovala istovremeno sa favorizovanjem imunskih i drugih svojstava kao odgovor na nepovoljne uslove sredine, poput pojave epidemija i infekcija, izražene kontaminacije vode i nedostatka adekvatne hrane.

6. ZAKLJUČAK

Analize drevne DNK imaju veliki značaj za dobijanje informacija o prošlosti, ali se moraju posmatrati zajedno sa arheološkim i antropološkim podacima. Multidisciplinarnost antropoloških istraživanja neophodna je da bi se razumeli sredinski, kulturni ili ekonomski faktori koji su uticali na migraciju ljudi, njihovo mešanje i oblikovanje savremene varijabilnosti i današnjih društava.

Osnovni zaključci na osnovu analiza drevne DNK na 24 skeletna ostatka sa Mokrina doprineli su razumevanju ove drevne zajednice, ali će veća paleogenetička studija celog Mokrina i moriške kulture u budućnosti biti od velikog značaja za praćenje socijalne evolucije svih rano-bronzanodopskih društava. Nekoliko rezultata genetičkih analiza rasvetlili su važna pitanja o društvenoj organizaciji populacije sa Mokrina:

1. Srodnički odnosi detektovani su između 15 pojedinaca: tri roditeljske veze, veza između braće, između brata i sestre, tri veze drugog stepena srodstva i jedna rođačka veza. Izuzev dve individue koje su sahranjene u grobovima 260 i 228, srodnici su sahranjeni u neposrednoj blizini što pokazuje da je nekropola organizovana oko porodičnih veza.

2. U dvojnog grobu potvrđena je srodnička veza drugog stepena, ali genetička veza između dve analizirane individue u trojnog grobu nije detektovana. Na osnovu ovog nalaza može se zaključiti da sahranjivanje u nekropoli u Mokrinu nije bilo uslovljeno isključivo srodničkim, već i socijalnim vezama. Takođe, članovi zajednice mogli su biti sahranjivani zajedno usled neobičnih, zadesnih okolnosti ili iz praktičnih i ekonomskih razloga.

3. Nasleđivanje društvenog statusa bilo je vezano za pol. Sinovi nisu nasleđivali socijalni status od svojih bioloških majki, ali su mogli nasleđivati veći ili manji potencijal da ga steknu kroz neku aktivnost i socijalni kvalitet. Žene su mogle naslediti status od majki ili ga postići putem socijalnih veza. Ne postoji dovoljno podataka za potvrđivanje ili odbacivanje hipoteze da su muška deca nasleđivala društveni status od očeva. Mokrin se po ovom pitanju razlikuje od drugih analiziranih rano-bronzanodopskih i kasno-

neolitskih društava u Evropi u kojima su muškarci mogli nasleđivati socijalni status i ugled.

4. Sličnost u sahranjivanju bogatijih i siromašnijih srodnika, ustanovljena na osnovu genetičke analize skeletnih ostataka i grobnih artefakata, kao i odsustvo dokaza da su postojale monumentalne građevine, ukazuju da razlike u društvenim statusima u Mokrinu nisu bile naročito izražene. Društvo u Mokrinu ne odlikuje izražena stratifikacija karakteristična za bronzano doba, za razliku od praistorijskih društava u centralnoj i zapadnoj Evropi.

5. Proširene porodice nisu pronađene u analiziranom uzorku ljudi sa Mokrina (moguće usled nedovoljne veličine uzoraka), čime se odbacuje hipoteza o podeljenosti nekropole na južni i severni deo na osnovu pripadnosti porodičnim linijama.

6. Visok diverzitet haplotipova mitohondrijskog genoma i Y hromozoma u mokrinskoj populaciji onemogućava donošenje sigurnog zaključka o praksi bračnog prebivališta. Društvo u Mokrinu nije bilo matrilokalno, ali ni strogo patrilokalno. Takvi podaci izdvajaju društvenu praksu zajednice iz Mokrina od društava sličnog vremenskog perioda u centralnoj i zapadnoj Evropi, i doprinose saznanju da su obrasci nasleđivanja i socijalne organizacije društava iz ovog perioda varirali regionalno i temporalno. Zajednička odlika svih do sada analiziranih društava iz ovog perioda jeste praktikovanje ženske egzogamije.

7. Genetičke analize populacije sa Mokrina uklapaju se u opseg genetičkih varijacija u savremenim populacijama ljudi u Evropi i ne pokazuju odstupanje od očekivanih proporcija porekla karakterističnog za bronzano doba. Nije ustanovljena veća genetička sličnost uzoraka sa Mokrina sa uzorcima moriške kulture, verovatno zbog izražene mobilnosti ljudi u ovom periodu i posledične nestrukturiranosti moriških populacija.

8. Odsustvo inbridinga, analize porekla i veliki diverzitet haplogrupa pokazuju da populacija sahranjena na Mokrinu nije bila izolovana od drugih zajednica. Iako je postojala određena socijalna hijerarhija u društvu, u populaciji nije bilo strogih geografskih i socio-kulturnih barijera u sklapanju brakova. Jedan od mogućih zaključaka

ove studije jeste da je nekropola u Mokrinu mogla biti korišćena od strane više zajednica moriške kulture, koje su opstajale kroz uspostavljanje rodbinskih veza i zajedničkih socijalnih i ekonomskih aktivnosti.

9. Analize gena za pigmentaciju kože pokazuju visoku učestalost alela za svetlu kožu, ali jedna genetička varijanta asocirana sa depigmentacijom (alel *SLC45A2*) nije fiksirana, što je očekivani nalaz uzimajući u obzir podatak da se povećanje učestalosti ovog alela dešavalo u kasnijem neolitu. Učestalost izvedenog alela *HERC2* za plave oči je umerena u populaciji sa Mokrina.

10. Niska učestalost alela za toleranciju na laktozu (svega 4.6%) u zajednici sa Mokrina odlikuje i populaciju iz bronzanodopskog arheološkog nalazišta Tolens u severnoj Nemačkoj, kao i nešto starije populacije poreklom iz stepa istočne Evrope. Brzo uvećanje učestalosti alela za laktoznu toleranciju, samo u poslednjih 3,000 godina (učestalost i do 70% u nekim savremenim evropskim populacijama), ukazuje na jak selektivni pritisak ($s = 0,06$) koji je favorizovao upotrebu ovog nutrijenta u ishrani.

LITERATURA

1. 1000 Genomes Project Consortium et al., (2012) An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* **491**: 56-65.
2. Abbas, A.K., and Lichtman, A.H., (2008) Osnovna imunologija: funkcija i poremećaji imunskog sistema. *Data Status, Treće izdanje, Beograd*.
3. Adler, C.J., et al., (2013) Sequencing ancient calcified dental plaque shows changes in oral microbiota with dietary shifts of the Neolithic and Industrial revolutions. *Nature Genetics* **45**(4): 450–455.
4. Allentoft, M.E., et al., (2012) The half-life of DNA in bone: Measuring decay kinetics in 158 dated fossils. *Proceedings of the Royal Society of London* **279**(1748): 4724-4733.
5. Allentoft, M.E., et al., (2015) Population genomics of Bronze Age Eurasia. *Nature* **522**: 167–172.
6. Alt, K.W., and Vach, W., (1995) Odontologic kinship analysis in skeletal remains: concepts, methods, and results. *Forensic Science International* **74**: 99-113.
7. Alt, K.W., et al., (1997) Twenty-Five Thousand-Year-Old Triple Burial From Dolni Vestonice: An Ice-Age Family? *American Journal of Physical Anthropology* **102**: 123–131.
8. Alt, K.W., and Vach, W., (1998) Kinship Studies in Skeletal Remains — Concepts and Examples. In: Alt, K.W., Rösing, F.W., Teschler-Nicola, M., (eds) *Dental Anthropology*. Springer, Vienna.
9. Alvarez, G., Ceballos, F.C., and Quinteiro, C., (2009) The role of inbreeding in the extinction of a European royal dynasty. *PLoS ONE* **4**: e5174.
10. Ames, K.M., (2007) The Archaeology of rank. In *Handbook of Archaeological Theories*, (eds. Bently, R.A., Maschner, D.G.H., and Chippenale, C.). AltaMira Press: 487-513.
11. Amorim, A., and Pereira, L., (2005) Pros and cons in the use of SNPs in forensic kinship investigation: a comparative analysis with STRs. *Forensic Science International* **150**(1): 17-21.

12. Amorim, C.D.G., et al., (2018) Understanding 6th-century barbarian social organization and migration through paleogenomics. *Nature Communications* **9**(1): 1-11.
13. Anderson, A.D., and Weir, B.S., (2007) A Maximum-likelihood method for the estimation of pairwise relatedness in structured populations. *Genetics* **176**: 421-440.
14. Anderson, S., et al., (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**(5806): 457-65.
15. Anthony, D.W., (2013) Two IE phylogenies, three PIE migrations, and four kinds of steppe pastoralism. *Anthropology Department, Hartwick College (Oneonta, New York)*.
16. Bellemain, E., et al., (2013) Fungal palaeodiversity revealed using high-throughput metabarcoding of ancient DNA from arctic permafrost. *Environmental microbiology* **15**(4): 1176-1189.
17. Bengtsson, C.F., et al., (2012) DNA from keratinous tissue. Part I: Hair and nail. *Annals of Anatomy* **194**: 17– 25.
18. Bentley, D., et al., (2008) Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* **456**: 53–59.
19. Bertemes, F., and Heyd, V., (2015) 2200 BC – Innovation or Evolution: Genesis of the Danubian EBA. In: *2200 BC – A climatic breakdown as a cause for the collapse of the old world? 7th Arch. Conference Central Germany, Oct. 23–26, 2014. Tagungen Landesmus. Vorgesch. 12 (Halle)*: 561-578.
20. Bhatia, G., et al., (2013) Estimating and interpreting Fst: The impact of rare variants. *Genome Research* **23**: 1514-1521.
21. Binford, L.R., (1971) Mortuary Practices: Their study and their potential. *Memoirs of the Society for American Archaeology* **25**: 6-29.
22. Bittles, A.H., and Black, M.L., (2010) Consanguineous Marriage and Human Evolution. *Annual Review of Anthropology* **39**: 193–207.
23. Boehm, C., et al., (1993) Egalitarian Behavior and Reverse Dominance Hierarchy. *Current Anthropology* **34**: 227-254.
24. Bökönyi, S., (1972) Životinjski ostaci iz grobova nekropole bronzanog doba u Mokrinu. In *Mokrin II: Nekropola Ranog Bronzanog Doba, Dissertationes et*

- Monographie XII, S. Foltiny, Ed. (Washington, Kikinda i Beograd: Smithsonian Institution, Narodni muzej, Arheološko društvo Jugoslavije, Jugoslavija: 91 – 96.*
25. Bolger, A.M., Lohse, M., and Usadel, B., (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **30**, 2114–2120.
 26. Bollongino, R., et al., (2013) 2000 years of parallel societies in stone age central europe. *Science* **342**: 479–481.
 27. Bollongino, R., Tresset, A., and Vigne, J.D., (2008) Environment and excavation: pre-lab impacts on ancient DNA analyses. *Comptes Rendus Palevol* **7**: 91–98.
 28. Bos, K.I., et al., (2011) A draft genome of *Yersinia pestis* from victims of the Black Death. *Nature* **478**(7370): 506-510.
 29. Bowles, S., Smith, E.A., and Borgerhoff Mulder, M., (2010) The emergence and persistence of inequality in premodern societies: introduction to the special section. *Current Anthropology* **51**(1): 7-17.
 30. Bramanti, B., et al., (2009) Genetic discontinuity between local hunter-gatherers and central Europe's first farmers. *Science* **326**(5949): 137-140.
 31. Brandt, G., et al., (2013) Ancient DNA reveals key stages in the formation of central European mitochondrial genetic diversity. *Science* **342**(6155): 257-261.
 32. Brandt, G., et al., (2015) Human paleogenetics of Europe—The known knowns and the known unknowns. *Journal of human evolution* **79**: 73-92.
 33. Branicki, W., Brudnik, U., and Wojas-Pelc, A., (2009) Interactions Between HERC2, OCA2 and MC1R May Influence Human Pigmentation Phenotype. *Annals of Human Genetics* **73**: 160–170.
 34. Briggs, A.W., et al., (2007) Patterns of damage in genomic DNA sequences from a Neandertal. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **104**(37): 14616–14621.
 35. Briggs, A.W., et al., (2010) Removal of deaminated cytosines and detection of in vivo methylation in ancient DNA. *Nucleic acids research* **38**(6): e87-e87.
 36. Brotherton, P., et al., (2007) Novel high-resolution characterization of ancient DNA reveals C>U-type base modification events as the sole cause of post mortem miscoding lesions. *Nucleic acids research* **35**(17): 5717-5728.
 37. Brotherton, P., et al., (2013) Neolithic mitochondrial haplogroup H genomes and the genetic origins of Europeans. *Nature Communications* **4**: 1764.

38. Broushaki, F., et al., (2016) Early Neolithic genomes from the eastern Fertile Crescent. *Science* **6298**: 499–503.
39. Buikstra, J.E., et al., (1990) Skeletal Biological Distance Studies in American Physical Anthropology: Recent trends. *American Journal of Physical Anthropology* **82**: 1-7.
40. Buikstra, J.E., and Ubelaker, D.H., (1994) Standards for data collection from human skeletal remains. *Arkansas Archeological Survey, Fayetteville*.
41. Burbano, H.A., et al., (2010) Targeted investigation of the Neandertal genome by array-based sequence capture. *Science* **328**(5979): 723-725.
42. Burger, J., et al., (2007) Absence of the lactase-persistence-associated allele in early neolithic Europeans. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **104**(10): 3736-3741.
43. Burger, J., et al., (2020) Low prevalence of lactase persistence in Bronze Age Europe indicates ongoing strong selection over the last 3,000 years. *Current Biology* **30**(21): 4307-4315.
44. Bushnell B., Rood, J., and Singer, E., (2017) BBMerge - Accurate paired shotgun read merging via overlap. *PLoS ONE* **12**: e0185056.
45. Campbell, M.C., and Tishkoff, S.A., (2010) The evolution of human genetic and phenotypic variation in Africa. *Current Biology* **20**(4): R166-R173.
46. Campos, P.F., and Gilbert, M.T.P., (2019) DNA extraction from keratin and chitin. In *Ancient DNA, Chapter 7, Humana Press, New York, NY*: 57-63.
47. Canturk, K.M., et al., (2014) Current Status of the Use of Single-Nucleotide Polymorphisms in Forensic Practices. *Genetic testing and molecular biomarkers* **18**(7): 455–460.
48. Carpenter, M.L., et al., (2013) Pulling out the 1%: whole-genome capture for the targeted enrichment of ancient DNA sequencing libraries. *The American Journal of Human Genetics* **93**(5): 852-864.
49. Carr, C., (1995) Mortuary practices: Their social, philosophical-religious, circumstantial, and physical determinants. *Journal of Archaeological Method and Theory* **2**: 105–200.

50. Cassidy, L.M., et al., (2016) Neolithic and Bronze Age migration to Ireland and establishment of the insular Atlantic genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **113**: 368–373.
51. Cassidy, L.M., et al., (2020) A dynastic elite in monumental Neolithic society. *Nature* **582**(7812): 384-388.
52. Castellano, S., et al., (2014) Patterns of coding variation in the complete exomes of three Neandertals. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **111**(18): 6666-6671.
53. Ceballos, F.C., et al., (2018) Runs of homozygosity: windows into population history and trait architecture. *Nature Reviews Genetics* **19**(4): 220-234.
54. Cederlund, A., et al., (2013) Lactose in human breast milk an inducer of innate immunity with implications for a role in intestinal homeostasis. *PLoS ONE* **8**(1): e53876.
55. Chaitanya, L., et al., (2018) The HIrisPlex-S system for eye, hair and skin colour prediction from DNA: Introduction and forensic developmental validation. *Forensic Science International: Genetics* **35**: 123-135.
56. Champlot, S., et al., (2010) An Efficient Multistrategy DNA Decontamination Procedure of PCR Reagents for Hypersensitive PCR Applications. *PLoS ONE* **5**(9): e13042.
57. Chang, C.C., et al., (2015) Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. *Gigascience* **4**: 7.
58. Chaplin, G., and Jablonski, N.G., (2009) Vitamin D and the evolution of human depigmentation. *American Journal of Physical Anthropology: The Official Publication of the American Association of Physical Anthropologists* **139**(4): 451-461.
59. Charlesworth, D., and Willis, J.H., (2009) The genetics of inbreeding depression. *Nature Review Genetics* **10**(11): 783-96.
60. Cook, G.C., (1978) Breath hydrogen concentrations after oral lactose and lactulose in tropical malabsorption and adult hypolactasia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **72**(3): 277-281.

61. Cordain, L., Hickey, M.S., and Kim, K., (2012) Malaria and ricketts represent selective forces for the convergent evolution of adult lactase persistence. *Biodiversity in Agriculture: Domestication, Evolution, and Sustainability* **299**.
62. Crews, D.E., and Bogin, B., (2010) Growth, Development, Senescence, and Aging: A Life History Perspective, *In: A companion to biological anthropology, Chapter 7, Blackwell Publishing*: 124-153.
63. Cronk, L., et al., (2019) Kin terms and fitness interdependence. *Evolution and Human Behavior* **40**: 281–291.
64. Cruciani, F., et al., (2011) A revised root for the human Y chromosomal phylogenetic tree: the origin of patrilineal diversity in Africa. *The American Journal of Human Genetics* **88**(6): 814-818.
65. Dabney, J., et al., (2013) Ancient DNA Damage. *Cold Spring Harbour Perspectives in Biology* **5**(7): a012567.
66. Dabney, J., et al., (2013) Complete mitochondrial genome sequence of a Middle Pleistocene cave bear reconstructed from ultrashort DNA fragments. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **110**(3): 15758–15763.
67. Damgaard, P.B., et al., (2015) Improving access to endogenous DNA in ancient bones and teeth. *Scientific Reports* **5**: 11184.
68. Danecek, et al., (2011) The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics* **27**: 2156–2158.
69. Daub, J.T., (2015) Inference of Evolutionary Forces Acting on Human Biological Pathways. *Genome Biology and Evolution* **7**(6): 1546–1558.
70. Deguilloux, M.H., et al., (2014) Ancient DNA and kinship analysis of human remains deposited in Merovingian necropolis sarcophagi (Jau Dignac et Loirac, France, 7- the 8th century AD). *Journal of Archaeological Science* **41**: 399-405.
71. Der Sarkissian, C., et al., (2014) Shotgun microbial profiling of fossil remains. *Molecular ecology* **23**(7): 1780-1798.
72. DeSalle, R., et al., (1992) DNA sequences from a fossil termite in Oligo-Miocene amber and their phylogenetic implications. *Science* **257**(5078): 1933-1936.
73. Donnelly, M.P., et al., (2012) A global view of the OCA2-HERC2 region and pigmentation. *Human Genetics* **131**: 683–696.

74. Drennan, R.D., Peterson, C.E., and Fox, J.R., (2010) Degrees and Kinds of Inequality. *In Pathways to Power. Fundamental Issues in Archaeology* (eds. Price, T. D. & Feinman, G. M., Springer, New York, NY): 45–76.
75. Earle, T.K., (1987) Chiefdoms in archaeological and ethnohistorical perspective. *Annual review of anthropology* **16**(1): 279-308.
76. Ember, M., and Ember, C.R., (1971) The conditions favoring matrilineal versus patrilineal residence. *American Anthropologist* **73**(3): 571-594.
77. Enattah, N.S., et al., (2002) Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia. *Nature genetics* **30**(233).
78. Endródi, A., and Pásztor, E., (2006) Symbolism and traditions in the society of the Bell Beaker – Csepel group. *Archaeologiai Értesítő* **131**: 7–25.
79. Enk, J.M., et al., (2014) Ancient whole genome enrichment using baits built from modern DNA. *Molecular biology and evolution* **31**(5): 1292-1294.
80. Ensor, B.E., et al., (2017) The Bioarchaeology of Kinship: Proposed Revisions to Assumptions Guiding Interpretation. *Current Anthropology* **58**(6).
81. Farkas, G., and Liptak P., (1971) Antropološko istraživanje nekropole u Mokrinu iz ranog bronzanog doba. *In Mokrin: Nekropola Ranog Bronzanog Doba, Dissertationes et Monographie XI, M. Girić, Ed. (Washington, Kikinda i Beograd: Smithsonian Institution, Narodni muzej, Arheološko društvo Jugoslavije, Jugoslavija): 239–271.*
82. Flatz, G., and Rotthauwe, H., (1973) Lactose nutrition and natural selection. *The Lancet* **302**(7820): 76-77.
83. Freilich, S., et al., (2022) Reconstructing genetic histories and social organisation in Neolithic and Bronze Age Croatia. *Scientific Reports* **11**:16729.
84. Fried, M.H., (1967) The evolution of political society: an essay in political anthropology. *McGraw-Hill, New York: Random House, New York.*
85. Fu, Q., et al., (2013) DNA analysis of an early modern human from Tianyuan Cave, China. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **110**(6): 2223–2227.
86. Fu, Q., et al., (2013) A revised timescale for human evolution based on ancient mitochondrial genomes. *Current biology* **23**(7): 553-559.

87. Fu, Q., et al., (2014) Genome sequence of a 45,000-year-old modern human from western Siberia. *Nature* **514**(7523): 445-449.
88. Fu, Q., et al., (2015) An early modern human from Romania with a recent Neanderthal ancestor. *Nature* **524**(7564): 216-219.
89. Fu, Q., et al., (2016) The genetic history of Ice Age Europe. *Nature* **534**: 200–205.
90. Fulton, T.L., Wagner, S.M., and Shapiro, B., (2012) Case study: recovery of ancient nuclear DNA from toe pads of the extinct passenger pigeon. In *Ancient DNA, Humana Press*: 29-35.
91. Furtwängler, A., et al., (2018) Ratio of mitochondrial to nuclear DNA affects contamination estimates in ancient DNA analysis. *Scientific Reports* **8**(14075).
92. Furtwängler, A., et al., (2020) Ancient genomes reveal social and genetic structure of Late Neolithic Switzerland. *Nature communications* **11**(1): 1-11.
93. Gallego Llorente, M., et al., (2015) Ancient Ethiopian genome reveals extensive Eurasian admixture in Eastern Africa. *Science* **350**: 820–22.
94. Gallego-Llorente, M., et al., (2016) The genetics of an early Neolithic pastoralist from the Zagros, Iran. *Scientific Reports* **6**(31326).
95. Gamba, C., et al., (2014) Genome flux and stasis in a five millennium transect of European prehistory. *Nature Communications* **5**(5257).
96. Gamba, C., et al., (2016) Comparing the performance of three ancient DNA extraction methods for high-throughput sequencing. *Molecular ecology resources* **16**(2): 459-469.
97. Gansauge, M.T., and Meyer, M., (2013) Single-stranded DNA library preparation for the sequencing of ancient or damaged DNA. *Nature Protocols* **8**(4): 737–748.
98. Gibson, G.R., et al., (2017) Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* **14**(8): 491-502.
99. Gilbert, M.T.P., et al., (2007) Whole genome shotgun sequencing of mitochondria from ancient hair shafts. *Science* **317**(5846): 1927–1930.
100. Gill, P., et al., (1994) Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nature Genetics* **6**: 130-135.

101. Ginolhac, A., et al., (2011) mapDamage: testing for damage patterns in ancient DNA sequences. *Bioinformatics* **27**(15): 2153-2155.
102. Girić, M., (1987) Naselja moriške kulture. *Rad vojvođanskih muzeja* **30**: 71-85.
103. Girić, M., (1971) Mokrin. Nekropola ranog bronzanog doba: Mokrin. The early bronze age necropolis (*Dissertationes et monographie XI. Washington, Kikinda i Beograd: Smithsonian Institution, Narodni muzej, Arheološko društvo Jugoslavije, Jugoslavija*).
104. Gokhman, D., et al., (2016) Epigenetics: It's Getting Old. Past Meets Future in Paleoepigenetics. *Review* **31**(4): 290-300.
105. Golenberg, E.M., et al., (1990) Chloroplast DNA sequence from a Miocene Magnolia species. *Nature* **344**: 656–58.
106. Green, R.E., et al., (2009) The Neandertal genome and ancient DNA authenticity. *The EMBO journal* **28**(17): 2494-2502.
107. Green, R.E., et al., (2010) A draft sequence of the Neandertal genome. *Science* **328**: 710-722.
108. Haak, W., et al., (2008) Ancient DNA, strontium isotopes, and osteological analyses shed light on social and kinship organization of the Later Stone Age. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **105**: 18226–18231.
109. Haak, W., et al., (2010) Ancient DNA from European early neolithic farmers reveals their near eastern affinities. *PLoS Biology* **8**: e1000536.
110. Haak, W., et al., (2015) Massive migration from the steppe was a source for Indo-European languages in Europe. *Nature* **522**: 207–211.
111. Hagelberg, E., and Clegg, J.B., (1991) Isolation and characterization of DNA from archaeological bone. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **244**(1309): 45-50.
112. Haile, J., (2012) Ancient DNA extraction from soils and sediments. *In Ancient DNA, Humana Press*: 57-63.
113. Hamilton, W.D., (1964) The genetical evolution of social behaviour I. II. *Journal of Theoretical Biology* **7**(1): 1-52.
114. Hamilton, M., (2013) Population genetics. *Wiley-Blackwell, New Jersey, USA*.
115. Hansen, H.B., et al., (2017) Comparing Ancient DNA Preservation in Petrous Bone and Tooth Cementum. *PloS ONE* **12**(1): e0170940.

116. Harding, A.F., (2000) *European Societies in the Bronze Age*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
117. Hayden, B., and Villeneuve, S., (2010) Who Benefits from Complexity? A View from Futuna. In *Pathways to Power. Fundamental Issues in Archaeology* (eds. Price, T. D., and Feinman, G. M.). Springer, New York, NY: 95–145.
118. Head, S.R., et al., (2014) Library construction for next-generation sequencing: overviews and challenges. *Biotechniques* **56**(2): 61-77.
119. Higuchi, R., et al., (1984) DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature* **312**(5991): 282-284.
120. Hofmanová, Z., et al., (2016) Early farmers from across Europe directly descended from Neolithic Aegeans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **113**: 6886–6891.
121. Hofreiter, M., et al. (2001) Ancient DNA. *Nature Reviews Genetics* **2**(5): 353-359.
122. <https://reich.hms.harvard.edu/downloadable-genotypes-present-day-and-ancient-dna-data-compiled-published-papers>; 2019
123. <https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms.html>
124. <https://www.nature.com/articles/d41586-021-00442-z>
125. Ingman, M., et al., (2000) Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nature* **408**(6813): 708-713.
126. Itan, Y., (2009) The Origins of Lactase Persistence in Europe. *PLoS Computational Biology* **5**(8): e1000491.
127. Ivanović, A., and Kalezić, M., (2013) Evolucionarna biologija: teorijske postavke i geometrijska morfometrija. *Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu*.
128. Jacquard, A., (1974) *The Genetic Structure of Populations*. Springer-Verlag, New York, NY.
129. Johnson, K.M., and Paul, K.S., (2016) Bioarchaeology and kinship: Integrating theory, social relatedness, and biology in ancient family research. *Journal of Archaeological Research* **24**: 75-123.
130. Jónsson, H., et al., (2013) mapDamage2.0: fast approximate Bayesian estimates of ancient DNA damage parameters. *Bioinformatics* **29**: 1682–1684.

131. Ju, D., and Mathieson, I., (2021) The evolution of skin pigmentation-associated variation in West Eurasia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **118**(1).
132. Keller, A., et al., (2012) New insights into the Tyrolean Iceman's origin and phenotype as inferred by whole-genome sequencing. *Nature Communications* **3**: 698.
133. Kennett, D.J., et al., (2017) Archaeogenomic evidence reveals prehistoric matrilineal dynasty. *Nature Communications* **8**(14115).
134. Keyser-Tracqui, C., et al., (2003) Nuclear and Mitochondrial DNA Analysis of a 2,000-Year-Old Necropolis in the Egyin Gol Valley of Mongolia. *The American Journal of Human Genetics* **73**: 247–260.
135. Kimura, M., (1968) Evolutionary rate at the molecular level. *Nature* **217**(5129): 624-626.
136. Kircher, M., (2012) Analysis of High-Throughput Ancient DNA Sequencing Data. In *Ancient DNA: Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)* (ed. Beth Shapiro And) vol. 840, Humana Press, New York, NY: 197–228.
137. Kircher, M., and Kelso, J., (2010) High-throughput DNA sequencing—concepts and limitations. *Bioessays* **32**(6): 524-536.
138. Kircher, M., Sawyer, S., and Meyer, M., (2012) Double indexing overcomes inaccuracies in multiplex sequencing on the Illumina platform. *Nucleic Acids Research* **40**: e3.
139. Kistler, L., et al., (2020) Ancient Plant Genomics in Archaeology, Herbaria, and the Environment. *Annual Review Plant Biology* **71**:13.1–13.2.
140. Kivisild, T., (2017) The study of human Y chromosome variation through ancient DNA. *Human Genetics* **136**: 529–546.
141. Knapp, M., and Hofreiter, M., (2010) Next generation sequencing of ancient DNA: requirements, strategies and perspectives. *Genes* **1**(2): 227-243.
142. Knapp, M., et al., (2012) Setting the stage – building and working in an ancient DNA laboratory. *Annals of Anatomy* **194**: 3–6.
143. Knipper, C., et al., (2017) Female exogamy and gene pool diversification at the transition from the Final Neolithic to the Early Bronze Age in Central Europe. *Proceedings of the National Academy of Science* **114**(38): 10083-10088.

144. Korlević, P., et al., (2015) Reducing microbial and human contamination in DNA extractions from ancient bones and teeth. *Biotechniques* **59**(2): 87-93.
145. Korneliussen, T.S., and Moltke, I., (2015) NgsRelate: a software tool for estimating pairwise relatedness from next-generation sequencing data. *Bioinformatics* **31**(24): 4009-4011.
146. Korneliussen, T.S., Albrechtsen, A., and Nielsen, R., (2014) ANGSD: analysis of next generation sequencing data. *BMC bioinformatics* **15**(1): 1-13.
147. Krause, J., et al., (2010) The complete mitochondrial DNA genome of an unknown hominin from southern Siberia. *Nature* **464**: 894–897.
148. Krings, M., et al., (1997) Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell* **90**(1): 19-30.
149. Kristiansen, K., (1999) The emergence of warrior aristocracies in later European prehistory and their long-term history. In *Ancient warfare - archeological perspectives* (ed. by Carman, J., and Harding, A.). Chapter 11. Sutton publishing.
150. Kristiansen, K., and Larsson, T.B., (2005) The Rise of Bronze Age Society: Travels, Transmissions and Transformations. *Cambridge University Press, Cambridge, UK*.
151. Kristiansen, K., (2014) The Decline of the Neolithic and the Rise of Bronze Age Society. *The Oxford Handbook of Neolithic Europe* (ed. by Fowler, C., Harding, J., and Hofmann, D.). *Oxford University Press*.
152. Kristiansen, K., et al., (2017) Re-theorising mobility and the formation of culture and language among the Corded Ware Culture in Europe. *Antiquity* **91**(356): 334–347.
153. Kuch, M., and Poinar, H., (2012) Extraction of DNA from paleofeces. In: *Ancient DNA: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, eds. B. Shapiro and M. Hofreiter. (1st ed.). New York: Springer, Humana Press: 37–42.
154. Kuhlwilm, M., et al., (2016) Ancient gene flow from early modern humans into Eastern Neanderthals. *Nature* **530**: 429–433.
155. Kuhn, J.M.M., Jakobsson, M., and Günther, T., (2018) Estimating genetic kin relationships in prehistoric populations. *PLoS ONE* **13**: e0195491.

156. Laeng, B., Mathisen R., and Johnsen, J.A., (2007) Why do blue-eyed men prefer women with the same eye color? *Behavioral Ecology and Sociobiology* **61**(3): 371–384.
157. Lander, E.S., and Waterman, S., (1988) Genomic Mapping by Fingerprinting Random Clones: A Mathematical Analysis. *Genomics* **239**: 231–239.
158. Larsen, C.S., (2002) Bioarchaeology: The Lives and Lifestyles of Past People. *Journal of Archaeological Research* **10**(2): 119-166.
159. Larsen, C.S., and Walker, P.L., (2010) Bioarchaeology: Health, Lifestyle, and Society. *In Recent Human Evolution, A companion to biological anthropology, Chapter 21, Blackwell Publishing: 379-395.*
160. Lazaridis, I., et al., (2014) Ancient human genomes suggest three ancestral populations for present-day Europeans. *Nature* **513**: 409–413.
161. Lazaridis, I., et al., (2016) Genomic insights into the origin of farming in the ancient Near East. *Nature* **536**: 419–424.
162. Lazaridis, I., et al., (2022) A genetic probe into the ancient and medieval history of Southern Europe and West Asia. *Science* **377**: 940–951.
163. Legendre, M., et al. (2014) Thirty-thousand-year-old distant relative of giant icosahedral DNA viruses with a pandoravirus morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**(11): 4274-4279.
164. Li, H., and Durbin, R., (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* **25**: 1754–1760.
165. Li, H. and Durbin, R., (2011) Inference of human population history from individual whole-genome sequences. *Nature* **475**(7357): 493-496.
166. Lindahl, T., (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* **362**: 709–715.
167. Link, V., et al., (2017) ATLAS: Analysis Tools for Low-depth and Ancient Samples. *BioRxiv* 10.1101/105346.
168. Lipatov, M., et al., (2015) Maximum Likelihood Estimation of Biological Relatedness from Low Coverage Sequencing Data. *BioRxiv* 023374.
169. Lipson, M., et al., (2013) Efficient moment-based inference of admixture parameters and sources of gene flow. *Molecular biology and evolution* **30**(8): 1788-1802.

170. Lipson, M., et al., (2017) Parallel palaeogenomic transects reveal complex genetic history of early European farmers. *Nature* **551**: 368–372.
171. Lipson, M., (2020) Applying f4-statistics and admixture graphs: Theory and examples. *Molecular Ecology Resources* **20**(6): 1658-1667.
172. Ljuština, M., Krečković, M., and Radišić, T., (2019) Notes on Columbella Shells from the Bronze Age Necropolis Mokrin, Northern Serbia. In *Homage to Prof. dr Cristian Schuster on his 60th Anniversary* (ed. Comsa, A.). *Maiastra Publishing House, Targu Jiu*: 189-203.
173. Llamas, B., et al., (2017) From the field to the laboratory: Controlling DNA contamination in human ancient DNA research in the high-throughput sequencing era. *STAR: Science & Technology of Archaeological Research* **3**(1): 1-14.
174. MacHugh, D.E., et al., (2000) The extraction and analysis of ancient DNA from bone and teeth: A survey of current methodologies. *Ancient Biomolecules* **3**: 81–102.
175. Mallick, S., et al., (2016) The Simons Genome Diversity Project: 300 genomes from 142 diverse populations. *Nature* **538**: 201–206.
176. Malmström, H., et al., (2007) More on Contamination: The Use of Asymmetric Molecular Behavior to Identify Authentic Ancient Human DNA. *Molecular biology and evolution* **24**(4): 998–1004.
177. Marciniak, S., et al., (2015) Ancient human genomics: the methodology behind reconstructing evolutionary pathways. *Journal of human evolution* **79**: 21-34.
178. Marciniak, S., and Perry, G.H., (2017) Harnessing ancient genomes to study the history of human adaptation. *Nature Reviews Genetics* **18**(11): 659-674.
179. Mardis, E.R., (2008) Next-generation DNA sequencing methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* **9**: 387-402.
180. Margulies, M., et al., (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* **437**: 376–380.
181. Maričić, T., Whitten, M., and Pääbo, S., (2010) Multiplexed DNA sequence capture of mitochondrial genomes using PCR products. *PLoS ONE* **5**(11): e14004.
182. Mathieson, I., et al., (2015). Genome-wide patterns of selection in 230 ancient Eurasians. *Nature* **528**: 499–503.

183. Mathieson, I., et al. (2018) The genomic history of southeastern Europe. *Nature* **555**: 197–203.
184. Mattison, S.M., et al., (2016) The evolution of inequality. *Evolutionary Anthropology: Issues, News, and Reviews* **25**: 184–199.
185. McKenna, A., et al., (2010) The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Research* **20**: 1297–1303.
186. Metzker, M.L., (2010) Sequencing technologies - the next generation. *Nature Reviews Genetics* **11**: 31-46.
187. Meyer, C., et al., (2012) New approaches to the reconstruction of kinship and social structure based on bioarchaeological analysis of Neolithic multiple and collective graves. In *Theoretical and Methodological Considerations in Central European Neolithic Archaeology* (eds. Kolar, J., and Trampota, F.). *BAR International Series 2325*, Archaeopress, Oxford: 11–23.
188. Meyer, M., and Kircher, M., (2010) Illumina sequencing library preparation for highly multiplexed target capture and sequencing. *Cold Spring Harbor Protocols* **6**(5448).
189. Meyer, M., et al., (2012) A high-coverage genome sequence from an archaic Denisovan individual. *Science* **338**(6104): 222–226.
190. Meyer, M., et al., (2014) A mitochondrial genome sequence of a hominin from Sima de los Huesos. *Nature* **505**(7483): 403-406.
191. Meyer, M., et al., (2016) Nuclear DNA sequences from the Middle Pleistocene Sima de los Huesos hominins. *Nature* **531**(7595): 504-507.
192. Miller, W., et al., (2008) Sequencing the nuclear genome of the extinct woolly mammoth. *Nature* **456**(7220): 387–90.
193. Mitchell, D., et al., (2005) Damage and repair of ancient DNA. *Mutation Research* **571**: 265–276.
194. Mittnik, A., et al., (2018) The genetic prehistory of the Baltic Sea region. *Nature Communications* **9**(442).
195. Mittnik, A., et al., (2019) Kinship-based social inequality in Bronze Age Europe. *Science* **366**: 731–734.

196. Müller, J., (2017) Inheritance, population development and social identities: Europe 5200–4300 BCE. In *Balkan Dialogues Negotiating Identity Between Prehistory and the Present* (eds Gori, M., and Ivanova, M.). Routledge, London: 156–168.
197. Mullis, K.B., and Faloona, F.A., (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-chain reaction. *Methods in Enzymology* **155**: 335–350.
198. Ning, C., et al., (2021) Ancient genome analyses shed light on kinship organization and mating practice of Late Neolithic society in China Ning. *Science* **24**(103352).
199. Novembre, J., and Stephens, M., (2008) Interpreting principal component analyses of spatial population genetic variation. *Nature genetics* **40**(5): 646-649.
200. O’Shea, J.M., (1984) Mortuary variability: an archaeological investigation. *Academic Press, London, UK*.
201. O’Shea, J.M., (1992) A radiocarbon-based chronology for the Maros Group of southeast Hungary. *Antiquity* **66**: 97–102.
202. O’Shea, J.M., (1996) Villagers of the Maros: A Portrait of an Early Bronze Age Society. *Plenum Press, New York, NY*.
203. O’Shea, J.M., et al., (2019) Social formation and collapse in the Tisza-Maros region: dating the Maros Group and its Late Bronze Age successors. *Antiquity* **93**(369): 604-623.
204. O’Sullivan, et al., (2018) Ancient genome-wide analyses infer kinship structure in an Early Medieval Alemannic graveyard. *Science Advances* **4**(1262): 1–8.
205. Olalde, I., et al., (2014) Derived immune and ancestral pigmentation alleles in a 7,000-year-old Mesolithic European. *Nature* **507**: 225–228.
206. Olalde, I., et al., (2018) The Beaker phenomenon and the genomic transformation of northwest Europe. *Nature* **555**: 190–196.
207. Orlando, L., et al., (2011) True single-molecule DNA sequencing of a pleistocene horse bone. *Genome research* **21**(10): 1705-1719.
208. Orlando, L., et al., (2013) Recalibrating Equus evolution using the genome sequence of an early Middle Pleistocene horse. *Nature* **499**(7456): 74-78.
209. Orlando, L., Gilbert, M.T.P., and Willerslev, E., (2015) Reconstructing ancient genomes and epigenomes. *Nature Reviews Genetics* **16**(7): 395-408.

210. Overballe-Petersen, S., Orlando, L., and Willerslev, E., (2012) Next-generation sequencing offers new insights into DNA degradation. *Trends in biotechnology* **30**(7): 364-368.
211. Pääbo, S., (1985) Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA. *Nature* **314**(6012): 644-645.
212. Pääbo, S., et al., (2004) Genetic analyses from ancient DNA. *Annual Review Genetics* **38**: 645-79.
213. Pala, M., et al., (2012) Mitochondrial DNA signals of late glacial recolonization of Europe from near eastern refugia. *The American Journal of Human Genetics* **90**(5): 915-24.
214. Parker, C., et al., (2020) A systematic investigation of human DNA preservation in medieval skeletons. *Scientific Reports* **10**(18225).
215. Patterson, N., et al., (2012) Ancient admixture in human history. *Genetics* **192**: 1065–1093.
216. Peltzer, A., et al., (2016) EAGER: efficient ancient genome reconstruction. *Genome Biology* **17**: 60.
217. Pietruszewsky, M., (2008) Metric Analysis of Skeletal Remains: Methods and Applications, *In Biological Anthropology of the Human Skeleton, Second Edition, Chapter 16, John Wiley & Sons, Inc*: 487-533.
218. Pinhasi, R., et al., (2015) Optimal ancient DNA yields from the inner ear part of the human petrous bone. *PLoS ONE* **10**(6): e0129102.
219. Pinhasi, R., et al., (2019) Isolating the human cochlea to generate bone powder for ancient DNA analysis. *Nature protocols* **14**(4): 1194-1205.
220. Porčić M., and Stefanović, S., (2009) Physical activity and social status in Early Bronze Age society: The Mokrin necropolis. *Journal of Anthropological Archaeology* **28**: 259–273.
221. Posth, C., et al. (2016) Pleistocene mitochondrial genomes suggest a single major dispersal of non-africans and a late glacial population turnover in Europe. *Current Biology* **26**: 827–833.
222. Poznik, G.D., (2016) Identifying Y-chromosome haplogroups in arbitrarily large samples of sequenced or genotyped men. *BioRxiv* 10.1101/088716.

223. Price, T.D., and Feinman, G.M., (2010) Social Inequality and the Evolution of Human Social Organization. *In Pathways to power. Fundamental Issues in Archaeology* (eds. Price, T. D., and Feinman, G. M.). Springer, New York, NY: 1–14.
224. Prüfer, K., et al., (2014) The complete genome sequence of a Neanderthal from the Altai Mountains. *Nature* **505**: 43–49.
225. Pruvost, M., et al., (2007) Freshly excavated fossil bones are best for amplification of ancient DNA. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **104**(3): 739–744.
226. Pukaj, A., (2021) PhenoReport: A bioinformatic tool for phenotype predictions on ancient and modern DNA. *University of Mainz, Germany*.
227. Racimo, F., Renaud, G., and Slatkin, M., (2016) Joint estimation of contamination, error and demography for nuclear DNA from ancient humans. *PLOS Genetics* **12**(4):e1005972.
228. Racimo, F., et al., (2020) Beyond broad strokes: sociocultural insights from the study of ancient genomes. *Nature Reviews Genetics* **21**(6): 355-366.
229. Rask-Andersen, H., et al., (2012) Human cochlea: anatomical characteristics and their relevance for cochlear implantation. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology* **295**(11): 1791-1811.
230. Rasmussen, M., et al., (2010) Ancient human genome sequence of an extinct Palaeo-Eskimo. *Nature* **463**: 757–762.
231. Rasmussen, M., et al., (2015) Early Divergent Strains of *Yersinia pestis* in Eurasia 5,000 Years Ago. *Cell* **163**: 571–582.
232. Rega, E.A., (1995) Biological Correlates of Social Structure in the Early Bronze Age Cemetery at Mokrin. *University of Chicago, USA*.
233. Rega, E.A., (2000) The gendering of children in the early bronze age cemetery at Mokrin. *Gender Mater. Cult. Archaeol. Perspect.* [https:// doi. org/ 10. 1007/ 978-1- 349- 62334-1_15](https://doi.org/10.1007/978-1-349-62334-1_15).
234. Reich, D., et al., (2010) Genetic history of an archaic hominin group from Denisova Cave in Siberia. *Nature* **468**: 1053–1060.
235. Renaud, G., et al., (2015) Schmutzi: estimation of contamination and endogenous mitochondrial consensus calling for ancient DNA. *Genome biology* **16**(1): 1-18.

236. Ricaut, F.X., et al., (2010) Comparison Between Morphological and Genetic Data to Estimate Biological Relationship: The Case of the Egyin Gol Necropolis (Mongolia). *American Journal of Physical Anthropology* **143**: 355–364.
237. Richerson, P.J., and Boyd, R., (2000) Climate, culture and the evolution of cognition. *The evolution of cognition*, MIT Press: 329-45.
238. Rohland, N., and Hofreiter, M., (2007) Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Nature Protocols* **2**(7): 1756–1762.
239. Rohland, N., et al., (2015) Partial uracil–DNA–glycosylase treatment for screening of ancient DNA. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **370**(1660): 20130624.
240. Saag, L., et al., (2019) The arrival of Siberian ancestry connecting the eastern Baltic to Uralic speakers further east. *Current Biology* **29**(10): 1701-1711.
241. Sahlins, M.D., (1972) Stone age economics. *Aldine - Atherton, Inc, Chicago*.
242. Sánchez-Quinto, F., et al., (2019) Megalithic tombs in western and northern Neolithic Europe were linked to a kindred society. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **116**(19): 9469-9474.
243. Sanger, F., et al., (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors (DNA polymerase/nucleotide sequences/bacteriophage 4X174). *Biochemistry* **74**(12): 5463-5467.
244. Sankararaman, S., et al., (2014) The genomic landscape of Neanderthal ancestry in present-day humans. *Nature* **507**(7492): 354-357.
245. Sawyer, S., et al., (2012) Temporal patterns of nucleotide misincorporations and DNA fragmentation in ancient DNA. *PLoS ONE* **7**(3): e34131.
246. Saxe, A.A., (1970) Social dimensions of mortuary practices. *University of Michigan*.
247. Schroeder, H., et al., (2019) Unraveling ancestry, kinship, and violence in a Late Neolithic mass grave. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **116**(22): 10705–10710.
248. Schuenemann, V.J., et al., (2011) Targeted enrichment of ancient pathogens yielding the pPCP1 plasmid of *Yersinia pestis* from victims of the Black Death. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **108**(38): E746–E752.

249. Schuenemann, V.J., et al., (2013) Genome-wide comparison of medieval and modern *Mycobacterium leprae*. *Science* **341**(6142): 179-183.
250. Scott, R., (2008) Dental Morphology. In *Biological Anthropology of the Human Skeleton, Second Edition, Chapter 9, John Wiley & Sons, Inc, New York*: 265-299.
251. Sear, R., and Mace, R., (2008) Who keeps children alive? A review of the effects of kin on child survival. *Evolution and Human Behavior* **29**: 1–18.
252. Sear, R., (2018) Family and fertility: does kin help influence women’s fertility, and how does this vary worldwide? *Population Horizons* **14**(1): 18-34.
253. Sell, C., (2017) Addressing challenges of ancient DNA sequence data obtained with next generation methods. *University of Mainz, Germany*.
254. Shennan, S., (2018) *The First Farmers of Europe: An Evolutionary Perspective. Cambridge University Press, Cambridge, UK.*
255. Sikora, M., et al., (2014) Population Genomic Analysis of Ancient and Modern Genomes Yields New Insights into the Genetic Ancestry of the Tyrolean Iceman and the Genetic Structure of Europe. *PLoS Genetics* **10**(5): e1004353.
256. Sikora, M., et al., (2017) Ancient genomes show social and reproductive behavior of early Upper Paleolithic foragers. *Science* **358**: 659–662.
257. Sirak, K.A., et al., (2017) A minimally-invasive method for sampling human petrous bones from the cranial base for ancient DNA analysis. *BioTechniques* **62**: 283-289.
258. Sirak, K.A., et al., (2020) Human Auditory Ossicles as an Alternative Optimal Source of Ancient DNA. *Genome Research* **30**(3): 427–436.
259. Sjögren, K.G., et al., (2020) Kinship and social organization in Copper Age Europe. A cross-disciplinary analysis of archaeology, DNA, isotopes, and anthropology from two Bell Beaker cemeteries. *PLoS ONE* **15**(11): e0241278.
260. Skoglund, P., et al., (2013) Accurate sex identification of ancient human remains using DNA shotgun sequencing. *Journal of Archaeological Science* **40**: 4477–4482.
261. Skoglund, P., et al., (2014) Separating endogenous ancient DNA from modern day contamination in a Siberian Neandertal. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **111**(6): 2229–2234.

262. Skoglund, P., et al., (2016) Genomic insights into the peopling of the Southwest Pacific. *Nature* **538**: 510–13.
263. Slatkin, M., and Racimo, F., (2016) Ancient DNA and human history. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **113**(23): 6380–6387.
264. Smith, E.A., et al., (2010) Production Systems, Inheritance, and Inequality in Premodern Societies. *Current Anthropology* **51**: 85–94.
265. Smith, O., et al., (2014) A complete ancient RNA genome: identification, reconstruction and evolutionary history of archaeological Barley Stripe Mosaic Virus. *Scientific Reports* **4**(4003).
266. Smith, O., et al., (2019) Ancient RNA from Late Pleistocene permafrost and historical canids shows tissue-specific transcriptome survival. *PLoS Biology* **17**(7): e3000166.
267. Stefanović, S., (2008) Skeletal markers of occupational stress in later prehistory: Mokrin necropolis (2000–1800 B.C.). *University of Belgrade, Serbia*.
268. Stiller, M., et al., (2006) Patterns of nucleotide misincorporations during enzymatic amplification and direct large-scale sequencing of ancient DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**(37): 13578-13584.
269. Stojanović, D., et al., (2021) Skriveno zlato: SEM/EDX analiza nakita sa nekropole ranog bronzanog doba u Mokrinu. *Akta sa konferencije Nakit ostaje NAOS 2.0, Beograd, 24-25. Oktobar 2019*.
270. Stojanowski, C.M., and Schillaci, M.A., (2006) Phenotypic Approaches for Understanding Patterns of Intracemetery Biological Variation. *Yearbook of Physical Anthropology* **49**: 49–88.
271. Stone, A.C., et al., (1996) Sex determination of ancient human skeletons using DNA. *American Journal of Physical Anthropology: The Official Publication of the American Association of Physical Anthropologists* **99**(2): 231-238.
272. Stoneking, M., and Krause J., (2011) Learning about human population history from ancient and modern genomes. *Nature* **12**: 603-614.
273. Sverisdóttir, O.Ó., et al., (2014) Direct estimates of natural selection in Iberia indicate calcium absorption was not the only driver of lactase persistence in Europe. *Molecular biology and evolution* **31**(4): 975-983.

274. Szécsényi-Nagy, A., et al., (2015) Tracing the genetic origin of Europe's first farmers reveals insights into their social organization. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **282**(1805): 20150339.
275. Szécsényi-Nagy, A., et al., (2017) The maternal genetic make-up of the Iberian Peninsula between the Neolithic and the Early Bronze Age. *Scientific reports* **7**(1): 1-15.
276. Tarasov, A., et al., (2015) Sambamba: fast processing of NGS alignment formats. *Bioinformatics* **31**: 2032–2034.
277. Tishkoff, S., et al., (2007) Convergent adaptation of human lactase persistence in Africa and Europe. *Nature genetics* **39**(1): 31-40.
278. Tito, R.Y., et al., (2008) Phylotyping and Functional Analysis of Two Ancient Human Microbiomes. *PLoS ONE* **3**(11): e3703.
279. Tito, R.Y., et al., (2012) Insights from Characterizing Extinct Human Gut Microbiomes. *PLoS ONE* **7**(12): e51146.
280. Trotter, M.J., (1970) Estimation of stature from intact long bones. *In Personal Identification in Mass Disasters (ed. Stewart, T.D.). Smithsonian Institution Press, Washington, DC: 71–83.*
281. Tucić, N., (2003) Evolucionarna biologija, 2nd edition, *NNK - International, Beograd.*
282. Vai, S., et al., (2020) Kinship determination in archeological contexts through DNA analysis. *Frontiers in Ecology and Evolution* **8**: 83.
283. van de Loosdrecht, M., et al., (2018) Pleistocene North African genomes link Near Eastern and sub-Saharan African human populations. *Science* **360**(6388): 548-552.
284. Veeramah, K.R., et al., (2018) Population genomic analysis of elongated skulls reveals extensive female-biased immigration in Early Medieval Bavaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.* **115**: 3494–3499.
285. Wagner, D.M., et al., (2014) *Yersinia pestis* and the Plague of Justinian 541–543 AD: a genomic analysis. *The Lancet infectious diseases* **14**(4): 319-326.
286. Walker, C., and Thomas, M.G., (2019) The evolution of lactose digestion. *In Lactose. Academic Press: 1-48.*

287. Wang, C., et al., (2015) Improved Ancestry Estimation for both Genotyping and Sequencing Data using Projection Procrustes Analysis and Genotype Imputation. *The American Journal of Human Genetics* **96**: 926–937.
288. Warinner, C., et al., (2014) Pathogens and host immunity in the ancient human oral cavity. *Nature Genetics* **46**: 336–344.
289. Warinner, C., Speller, C., and Collins, M.J., (2015) A new era in palaeomicrobiology: prospects for ancient dental calculus as a long-term record of the human oral microbiome. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **370**: 20130376.
290. Weir, B.C., Anderson, A.D., and Hepler, A.B., (2006) Genetic relatedness analysis: modern data and new challenges. *Nature Reviews Genetics* **7**: 771–780.
291. Weissensteiner, H., et al., (2016) HaploGrep 2: mitochondrial haplogroup classification in the era of high-throughput sequencing. *Nucleic Acids Research* **44**: W58–63.
292. Wilde, S., et al., (2014) Direct evidence for positive selection of skin, hair, and eye pigmentation in Europeans during the last 5,000 y. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **111**(13): 4832–4837.
293. Willerslev, E., et al., (2003) Diverse plant and animal genetic records from Holocene and Pleistocene sediments. *Science* **300**(5620): 791–795.
294. Willerslev, E., et al., (2007) Ancient biomolecules from deep ice cores reveal a forested southern Greenland. *Science* **317**(5834): 111–114.
295. Witas, H.W., and Zawicki, P., (2004) Mitochondrial DNA and human evolution: A review. *Anthropological Review* **67**: 97–110.
296. Woodward, S.R., Weyand, N.J., and Bunnell, M., (1994) DNA sequence from Cretaceous period bone fragments. *Science* **266**(5188): 1229–1232.
297. Yaka, R., et al., (2021) Variable kinship patterns in Neolithic Anatolia revealed by ancient genomes. *Current Biology* **31**: 2455–2468.
298. Yang, D.Y., et al., (1998) Improved DNA extraction from ancient bones using silica-based spin columns. *American Journal of Physical Anthropology* **105**: 539–543.

299. Yang, D.Y., and Watt, K., (2005) Contamination controls when preparing archaeological remains for ancient DNA analysis. *Journal of Archaeological Science* **32**: 331–336.
300. Žegarac, A., (2019) Drevna DNK u arheologiji: od arheoloških iskopavanja do laboratorijskih analiza. *Glasnik Srpskog Arheološkog Društva* **35**: 319-335. УДК: 902.2:575, ISSN 0352-5678.
301. Žegarac, A., et al., (2021) Ancient genomes provide insights into family structure and the heredity of social status in the early Bronze Age of southeastern Europe. *Scientific Reports* **11**(1): 1-11.
302. Zhang, G., et al., (2013) Signatures of natural selection on genetic variants affecting complex human traits. *Applied & translational genomics* **2**: 78-94.

Prilog 1

1.1. DNK izolovanje

Dan I.

- Pre-liza - Svakom uzorku (0.15 g skeletnog praha), dodati 1 mL EDTA (0.5 M, pH8), vorteksovati i inkubirati na sobnoj temperaturi 10 minuta.
EDTA (engl. *Ethylen diamine tetra acetic acid*) zaustavlja enzimske reakcije tako što vezuje jone metala koji su neophodni kao kofaktori za funkcionisanje enzima. Na taj način, EDTA inhibira aktivnost DNKaza i doprinosi dobroj očuvanosti nukleinskih kiselina. EDTA takođe odstranjuje Ca^{++} i Fe^{++} jone iz hidroksiapatita i demineralizuje kosti, i obezbeđuje da se ostaci razbijenih ćelija i nečistoća grupišu dok je apsorpcija DNK za druge komponente u matriksu smanjena.
- Centrifugirati rastvor na maksimalnoj brzini 5 minuta. Pažljivo pomeriti supernatant bez pomeranja taloga i skladištiti ga u frižider.
- Dodati 1 ml izolacionog pufera svakom uzorku, koji dovodi do njihove lize. Negativna kontrola sadrži samo izolacioni pufer.

Reagensi	1ml (za 1 uzorak)
EDTA (0.5 M, pH8)	950 μl
Tris-HCl (1M, pH8)	20 μl
N-Laurilsarkozin (5%)	17 μl
Proteinaza K (14 – 22 mg/ml)	13 μl
Ukupno	1 ml

Prilikom demineralizacije kostiju i odstranjivanja Ca^{++} jona iz hidroksiapatita dejstvom EDTA, oslobađaju se i joni H^+ , čime se narušava pH, pa je potrebno dodati i Tris-HCl koji održava pH rastvora (Rohland and Hofreiter 2007). N-Laurilsarkozin (5%) je detardžent za koji je zapaženo da povećava prinos DNK na taj način što inhibira DNKaze, a takođe potpomaže lizu ćelija (MacHugh et al. 2000; Rohland and Hofreiter 2007). Proteinaza K degraduje histone i druge proteine prisutne u rastvoru i na taj način oslobađa DNK.

- Pokriti reakcione tubice parafilmom i vorteksovati dok rastvor ne postane homogen.

- Inkubirati uzorke na 37°C i 24 sata na termošejkeru (900 rpm) kako bi se DNK oslobodila.

Dan II

- Nakon završene inkubacije, centrifugirati uzorke 10 minuta na 10,000 rpm kako bi ćelijski ostaci i proteini formirali talog, dok DNK fragmenti ostaju difuzno raspoređeni u supernatantu.
- Pažljivo prebaciti supernatant u nove 1.5 ml tube (ekstrakt 1). Skladištiti ekstrakt 1 u frižideru.
- Pripremiti dodatni izolacioni pufer i dodati po 1 ml svakom uzorku. Zaštititi tubice parafilmom, vorteksovati i inkubirati ponovo na 37°C i 24 sata (900 rpm). Ovo će biti ekstrakt 2.

Dan III

- Nakon inkubacije, centrifugirati uzorke 10 minuta na 10,000 rpm.
- Sterilisati amikon filtere (*Amicon Ultra-4 30 kDA, 15 ml*) pod UV svetlom u trajanju od 30 minuta.
- Nakon lize, ekstrakt 1 i ekstrakt 2 se spajaju na Amikon filteru.
- Centrifugirati 10 min na 2500 rpm.
- Isprati DNK sa 3 ml 1x Tris-EDTA. Na pH = 8, nukleaze su manje aktivne, a takođe EDTA privlači jone neophodne za aktivnost ovih enzima pri čemu se DNK štiti od dalje degradacije.
- Centrifugirati na 2500 rpm ~20 minuta na Amikon filterima.
- Odbaciti ono što je prošlo filtere.
- Isprati dodatno sa svežih 3 mL 1X Tris-EDTA.
- Centrifugirati ponovo na 2500 rpm ~20 minuta na Amikon filterima.
- Prečišćavanje dvolančane DNK sa specijalno dizajniranim *QIAGEN MinElute* kolonama sa silika membranom (*Qiagen, Hilden, Germany*) od nukleotida, enzima, soli, pri čemu se dobija visoko koncentrovana DNK, fragmenata veličine veće od 70 bp. Efikasnost prečišćavanja zavisi od specijalnih uslova i u slučaju optimalnih uslova dostiže 80%.
 1. Zagrejati pufer za eluciju na 65°C.

2. Dodati 500 μ l pufera za vezivanje svakoj koloni sa silika gel membranom i 100 μ l svakog uzorka iz Amikon filtera. Mešati pažljivo pipetom.

DNK se adsorbuje na silika membranu u prisustvu visokih koncentracija haotropnih soli (koje destabilišu hidrofobne interakcije i omogućavaju vezivanje DNK za membranu na taj način što pozitivno naelektrisani joni prave most između negativno naelektrisane silike i DNK), i na pH 7.5. Efikasnost adsorpcije molekula smanjuje se sa porastom pH, ali se kontroliše dodavanjem 3M natrijum acetata, pH 5. So takođe čini DNK manje rastvorljivom u vodi pa se drugi mali organski molekuli rastvaraju u vodi.

- Centrifugirati kolone 1 min na 13,000 rpm. Filtrat odbaciti, a DNK ostaje vezana za silika gel.
- Dodati 750 μ l pufera za ispiranje (koji sadrži etanol) svakoj koloni. Pošto se DNK ne rastvara u etanolu, na ovaj način se uklanjaju sve preostale nečistoće, ostavljajući samo DNK vezanu za silika gel membranu.
- Centrifugirati kolone 1 min na 13,000 rpm. Odbaciti filtrat. Centrifugirati kolone ponovo 1 min na 13,000 rpm kako bi se dobro osušile. Pufer za vezivanje se mora kompletno isprati jer u slučaju visoke koncentracije soli, DNK se neće u potpunosti osloboditi sa silike. Takođe, etanol može uticati na rastvorljivost DNK u vodi prilikom elucije i mora se odstraniti.
- Prebaciti kolone u nove 1.5 ml tube.
- Isprati sa 44 μ l pufera za eluciju, inkubirati 5 min na sobnoj temperaturi.
Pufer za eluciju (10 mM Tris·Cl, pH 8.5 ili voda) oslobađa DNK sa silika membrane na dno epruvete i efikasan je u prisustvu soli niskih koncentracija i pH između 7 i 8.5. U slučaju elucije vodom DNK mora biti skladištena na -30°C do -15°C jer može doći do njene dalje degradacije u odsustvu Tris-a.
- Centrifugirati kolone 1 min na maksimalnoj brzini (13,000 rpm).
- Izolat staviti u frižider.

1.2. Prirema biblioteke za skrining uzoraka

1.2.1. Formiranje ravnih krajeva dvolančane DNK (engl. *Blunt End Repair*, *NEBNext End Repair Module*)

- Napraviti master miks (MM) i dodati 48.75 μ l MM-a u 20 μ l izolata (ukupna zapremina 70 μ l).

Reagens	Zapremina [μ l]	MM + 10%	N=24
NEBNext End Repair Enzyme Mix ⁴⁷	3.5	92.4	
NEBNext End Repair Reaction Buffer (10X)	7	184.8	
Voda	39.5	1042.8	
Uzorak	20		
Ukupno	70		

- Inkubirati najpre 15 minuta na 25°C, a potom 5 minuta na 12°C.

I	15 min	25 °C
II	5 min	12 °C

1.2.2. Prečišćavanje uzoraka sa *Qiagen MinElute* kolonama

- Dodati 350 μ l pufera za vezivanje izolatu koji sadrži DNK sa ravnim krajevima (odnos 5:1 u korist pufera za vezivanje).
- Centrifugirati kolone 1 min na 13,000 rpm. Odbaciti filtrat.
- Dodati 750 μ l pufera za prečišćavanje svakoj koloni.
- Centrifugirati kolone 1 min na 13,000 rpm. Odbaciti filtrat. Centrifugirati kolone ponovo 1 min na 13,000 rpm kako bi se osušile.
- Prebaciti kolone u nove *LoBind* 1.5 ml tube.
- Isprati sa 22 μ l of pufera za eluciju, inkubirati 5 minuta na sobnoj temperaturi. Centrifugirati kolone 1 min na 13,000 rpm. Čuvati rastvor u frižideru.

⁴⁷ *NEBnext end repair mix* sastoji se od: 2,5 mM dNTP u jednakim koncentracijama, 10 mg/ml BSA pufera, 10 mM ATP, T4 PNK i T4 polimeraze. BSA pufer se koristi kako bi se inhibicija PCR reakcije svela na minimum, pošto su koinhibitori obično koizolovani sa drevnom DNK. *NEBNext End Repair Reaction* pufer (10X, pH 7,5) sastoji se od: 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂ 10 mM DTT, 1 mM ATP.

1.2.3. Ligacija adaptera

- Pripremiti master miks (MM), DNK ligazu dodati na kraju i nežno promešati rastvor.

Reagens	Zapremina (µl)	Finalna conc.	MM + 10%	N=24
H ₂ O	10		264	
T4 DNK Ligaza pufer (10x)	4	1x	105.6	
PEG-4000 (50%)	4	5%	105.6	
T4 DNK Ligaza (5U/µl)	1	0,125 U/µl	26.4	
Adaptarmiks (30 µM), P5 i P7 (IDT, Leuven, Belgium)	1	0.75 µM	26.4	
Uzorak	20			
Ukupna zapremina	40			

T4 DNK ligaza katalizuje formiranje fosfodiesterne veze između 5' fosfatne grupe i 3' OH grupe u dvolančanoj DNK. Odnos između adaptera i fragmenata u ovoj reakciji bi trebalo da bude 10:1.

- Dodati 1 µl adapter miksa (30 µM) prečišćenoj DNK. Vorteksovati.
- Dodati 19 µl MM-a (ukupna zapremina rastvora = 40 µl). Vorteksovati.
- Inkubirati 30 minuta na 22°C.
- Prečistiti uzorke koristeći *Qiagen MinElute* kolone po protoklu opisanim iznad, sa jednom modifikacijom: dodati 200 µl pufera za vezivanje (odnos 5:1 u korist pufera za vezivanje u odnosu na uzorak).

1.2.4. Popunjavanje jednolančanih praznina DNK

Pripremiti master miks (MM) i dodati 20 µl MM-a prečišćenoj DNK sa adapterima (ukupna zapremina rastvora = 40 µl). Vorteksovati.

Reagens	Zapremina (µl)	Finalna conc	MM + 10%	N=24
H ₂ O	13.5		356.4	
TermoPol pufer (10x)	4	1x	105.6	
dNTP (10mM)	1	250µM	26.4	
Bst Polimeraza (8U/µl)	1.5	0, 3 U/µl	39.6	
Uzorak	20			
Ukupna zapremina	40			

- Inkubirati 20 minuta na 37°C, a potom i na 20 minuta na 80°C.

I	20 min	37 °C
---	--------	-------

II	20 min	80 °C
----	--------	-------

1.2.5. Dodavanje indeks sekvenci

- Dodati 20 µl master miksa (MM) u PCR tube, po 1 µl odgovarajućeg indeks adaptera P5 (5 µM) i P7 (5 µM), i 3 µl DNK uzorka (ukupna zapremina rastvora je 25 µl) (Tabela P1.1.). Vorteksovati.

Reagens	Zapremina (µl)	Finalna conc	MM + 10%	N=24
AccuPrime™ Pfx SuperMix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, United States)	20		528	
Index-Primer_P7 (5µM)	1	200 nM		
Index-Primer_P5 (5µM)	1	200 nM		
Uzorak	3			
Ukupna zapremina	25			

- Umnožavanje DNK na PCR-u.

1.2.6. Prečišćavanje uzoraka sa *MSB® Spin PCRapace* kolonama (*Invitex, Stratec Molecular, Berlin, Germany*)

- Zagrevanje pufera za eluciju na 65°C
- Dodati 250 µl pufera za vezivanje svakom uzorku i prebaciti rastvor u kolone.
- Centrifugirati kolone 2 min na 11,000 g. Odbaciti filtrat. Centrifugirati kolone ponovo 2 min na 11,000 g kako bi se osušile.
- Prebaciti kolone u nove *LoBind* 1.5 ml tube.
- Isprati sa 11 µl pufera za eluciju, inkubirati 5 min na sobnoj temperaturi, a zatim centrifugirati kolone 1 min na 11,000 g.

1.2.7. Kvantifikacija DNK fluorometrijskom metodom (*Qubit® Fluorometric dsDNA HS assay, Invitrogen*)

dsDNA HS assay kit je dizajniran i visoko selektivan za brzo merenje koncentracije dvolančane DNK u opsegu od 10 pg/µl do 100 ng/µl na sobnoj temperaturi na osnovu odnosa koncentracije dva standarda: S1 koji ne sadrži DNK, i S2 koji sadrži DNK visoke koncentracije.

- Pripremiti master miks (199 µl pufera + 1 µl boje) za jedan uzorak i standarde. S

obzirom da je boja senzitivna na svetlo, treba je zaštititi aluminijskom folijom.

- 1 μ l eluiranog produkta dodati u 199 μ l master miksa.
- Po 10 μ l standarda 1 i standarda 2 dodati u 190 μ l master miksa.
- Vorteksovati i inkubirati 2 minuta kako bi se postigla optimalna fluorescencija.
- Očitati koncentracije DNK (očitava kompletnu DNK, ne samo endogenu) najpre standarda, a posle i uzoraka.

1.2.8. Kvantifikacija DNK fragment analizom

Fragment analiza na *Agilent 2100 Bioanalyzer*-u je komercijalno dostupan sistem, baziran na principu gel elektroforeze⁴⁸ prebačenog u format čipa, čime se smanjuje vreme separacije nukleinskih kiselina i proteina (*Agilent 2100 Bioanalyzer High Sensitivity DNA manual*). Na čipu se nalaze međusobno povezani bunari za gel, uzorke i standard koji sadrži molekule poznatih veličina i koncentracija na osnovu kojih se formira standardna kriva migracije na osnovu veličine fragmenata i očitava koncentracija i veličina uzoraka. Za vreme pripreme čipa, polimer i fluorescentna boja ispunjavaju bunare i mikrokanale, dok elektrode takođe dolaze do bunara na čipu pri čemu čip postaje električno kolo. Naelektrisani biomolekuli započinju svoju migraciju. Zahvaljujući svom konstantnom odnosu između mase i naelektrisanja, molekuli se razdvajaju na osnovu veličine pri čemu će manji molekuli migrirati brže. Marker poznatih veličina su insertovani u biomolekule dozvoljavajući detekciju laserom i CCD kamerom, dok su podaci prebačeni u format elektroferograma. Na X osi se očitava veličina molekula, dok se na Y osi očitava njegov intenzitet, a koncentracija fragmenta je proporcionalna intenzitetu pika.

Čip je pripremljen na osnovu instrukcija proizvođača.

- Skladištiti reagense (gel koji sadrži boje, standard i marker) pola sata na sobnoj temperaturi u mraku.
- Očistiti elektrode pre korišćenja.
- 9 μ l gela dodati u tamnije obeležen bunar G.
- Postaviti čip u prajming stanicu kako bi se gel raširio na sve bunare na čipu. Ostaviti 1 min.

⁴⁸ Elektroforeza je standardna tehnika za razdvajanje molekula na osnovu njihove veličine i naelektrisanja. Kada se primeni električni potencijal pozitivni molekuli migriraju ka katodi dok negativni molekuli, kao što je i DNK, migriraju ka anodi različitim brzinama koje zavise od njihove veličine.

- Dodati 9 μ l gela i u ostale bunare označene sa G.
- Dodati 5 μ l markera u svaki bunar. Dva markera poznate koncentracije (“donji” i “gornji” markeri – prvi i poslednji pik na elektroforegramu), koriste se kao standardi za očitavanje veličine i koncentracije uzorka.
- Dodati 1 μ l standarda u bunar S.
- Dodati 1 μ l uzoraka u odgovarajućem razblaženju u ostale bunare sa markerom.
- Vorteksovati čip 1 min kako bi se eliminisali mehurići.

Sve negativne kontrole bile su čiste od kontaminacije, što je potvrđeno i fragment analizom na *Agilent Bioanalyzer*-u.

1.2.9. Spajanje uzoraka

- Vorteksovati magnetne sfere da se dobije homogena masa i staviti ih na sobnu temperaturu, 30 minuta.
- Podeliti spojene uzorke od 100 μ l na dva dela (jedan će biti prečišćeni, drugi ne). Zapremina spojenih uzoraka za sekvenciranje na *MiSeq* platformi iznosi 50 μ l.
- Dodati 1,8x količine magnetnih sfera uzorku (*MiSeq* 90 μ l). Vorteksovati.
- Inkubirati 5 minuta na sobnoj temperaturi.
- Staviti tubice na magnetno postolje i ponovo inkubirati 5 minuta na sobnoj temperaturi.
- Kada je DNK vezana za magnetne sfere, odstraniti pažljivo rastvor bez njihovog dodirivanja.
- Dodati 200 μ l 70% etanola.
- Inkubirati 1 minut.
- Odstraniti etanol pažljivo, bez dodirivanja magnetnih sfera.
- Ponoviti proces sa 200 μ l 70% etanola i inkubacijom od 1 minuta. Odstraniti ponovo etanol pažljivo.
- Staviti tubice na termalni blok na 37°C, 3-5 minuta kako bi se pelet osušio.
- Dodati 50 μ l pufera za eluciju peletu. Vorteksovati sve dok se ne dobije potpuno homogena masa.
- Centrifugirati 2 minuta, 13,000 rpm.

- Inkubirati 2 minuta na sobnoj temperaturi van magnetnog postolja, a zatim ih vratiti na magnetno postolje na inkubaciju od još 3 minuta.
- Prebaciti eluat u nove 1,5 ml *LoBind* tubice bez magnetnih sfera jer oni mogu uticati na dalje analize.

Tabela P1.1. Priprema, kvantifikacija i spajanje uzoraka i kontrola za skrining na *MiSeq Illumina* platformi bez *USER* tretmana.

Biblioteka	Uzorak	Indeks I7	Sekvenca I7	Indeks I5	Sekvenca I5	Qubit (ng / μ l)	μ l za spajanje
LIB1_1_1	Mok 9B	701	TAAGGCGA	501	CTCTCTAT	13.3	1.80
LIB1_2_1	Mok 12	702	CGTACTAG	502	TATCCTCT	12.9	1.85
LIB1_3_1	Mok 13	703	AGGCAGAA	503	GTAAGGA	12.4	1.93
LIB1_4_1	Mok 14	704	TCCTGAGC	504	ACTGCAT	20.2	1.18
LIB1_5_1	Mok 15	705	GGACTCCT	505	AAGGAGT	18.5	1.29
LIB1_6_1	Mok 16A	706	TAGGCATG	506	CTAAGCC	0.76	31.45
LIB1_7_1	Mok 17A	707	CTCTCTAC	507	CGTCTAA	18.4	1.30
LIB1_8_1	Mok 18A	708	CGAGGCTG	508	TCTCTCCG	17.5	1.37
LIB1_9_1	Mok 19A	709	AAGAGGCA	509	TCGACTA	21.8	1.10
LIB1_10_	Mok 20	710	GTAGAGGA	510	TTCTAGCT	14.8	1.61
LIB1_11_	Mok 21A	711	GCTCATGA	511	CCTAGAG	23.2	1.03
LIB1_12_	Mok 22	712	ATCTCAGG	512	GCGTAAG	20.6	1.16
LIB2_1_1	Mok 23	715	GCGTAGTA	515	GAGCCTT	41.1	1.16
LIB2_2_1	Mok 24A	716	CGGAGCCT	516	TTATGCG	21.1	1.13
LIB2_3_1	Mok 25A	717	TACGCTGC	501	CTCTCTAT	22.6	1.06
LIB2_4_1	Mok 26A	718	ATGCGCAG	502	TATCCTCT	13.9	1.72
LIB2_5_1	Mok 27	719	TAGCGCTC	503	GTAAGGA	22.3	1.07
LIB2_6_1	Mok 28A	720	ACTGAGCG	504	ACTGCAT	16.7	1.43
LIB2_7_1	Mok 29A	721	CCTAAGAC	505	AAGGAGT	15.9	1.50
LIB2_8_1	Mok 30	722	CGATCAGT	506	CTAAGCC	17.3	1.38
LIB2_9_1	Mok 31	723	TGCAGCTA	507	CGTCTAA	10.9	2.19
LIB2_10_	Mok 32	724	TCGACGTC	508	TCTCTCCG	15.3	1.56
LIB2_11_	Mok 33	701	TAAGGCGA	509	TCGACTA	23.2	1.03
LIB2_12_	Mok 10B	702	CGTACTAG	510	TTCTAGCT	17.7	1.35
SL28_7_1	MC_27-09-18	711	GCTCATGA	503	GTAAGGA	0.279	10.75
SL28_8_1	MC_28-09-18	712	ATCTCAGG	504	ACTGCAT	0.87	3.45
SL28_9_1	MC_01-10-18	713	ACTCGCTA	505	AAGGAGT	0.604	4.97
SL28_6_1	EK1	710	GTAGAGGA	502	TATCCTCT	0.325	9.23
	EK2	714	GGAGCTAC	506	CTAAGCC	0.642	4.67
	NH	713	ACTCGCTA	513	CTATTAA	21.5	-
LIB1_14_	LK1	714	GGAGCTAC	514	AAGGCTA	0.217	13.82
	PK1	714	GGAGCTAC	514	AAGGCTA	0.319	-
	PK2	714	GGAGCTAC	514	AAGGCTA	0.356	-
	NH	703	AGGCAGAA	511	CCTAGAG	28.5	-
LIB2_14_	LK2	704	TCCTGAGC	512	GCGTAAG	1.09	2.75

	PK1	704	TCCTGAGC	512	GCGTAAG	1.74	-
	PK2	704	TCCTGAGC	512	GCGTAAG	0.872	-

1.2.10. Priprema uzoraka za sekvenciranje celih genoma

- Dodati 5 μ l *USER* enzima (1 U/ μ l) u 16.25 μ l DNK izolata, mešati pipetom.

Reagens	Zapremina [μ l]
USER enzim	5
DNK izolat	16.25
Ukupna zapremina	21.25

- Inkubirati 3 sata na 37°C.
- Nastaviti pripremu biblioteke kao u prethodno opisanim koracima (Prilog 1.2), sa dodavanjem novih jedinstvenih kombinacija indeks sekvenci (Tabela P1.2.).

Tabela P1.2. Priprema, kvantifikacija i spajanje uzoraka za duboko sekvenciranje na NovaSeq 6000 Illumina platformi sa *USER* tretmanom

Biblioteka	Uzorak	Indeks I7	Sekvenca I7	Indeks I5	Sekvenca I5	Broj PCR ciklusa	Qubit (μ g / μ l)	μ l za spajanje
Lib 3 1-1	Mok 9B	701	TCGCCTTA	501	CTCTCTAT	10	27.12	5.10
Lib 3 2-1	Mok 12	702	CTAGTACG	502	TATCCTCT	10	23.8	7.40
Lib 3 3-1	Mok 13	703	TTCTGCCT	503	GTAAGGAG	10	23.1	5.20
Lib 3 4-1	Mok 14	704	GCTCAGGA	504	ACTGCATA	10	18.9	5.27
Lib 3 5-1	Mok 15	705	GGA CTCT	505	AAGGAGTA	10	24.7	5.80
Lib 3 6-1	Mok 16A	706	TAGGCATG	506	CTAAGCCT	12	42.2	4.46
Lib 3 7-1	Mok 17A	707	CTCTCTAC	507	CGTCTAAT	10	49.6	4.93
Lib 3 8-1	Mok 18A	708	CGAGGCTG	508	TCTCTCCG	10	47.1	31.51
Lib 3 9-1	Mok 9A	709	AAGAGGCA	509	TCGACTAG	10	55	3.94
Lib 3 10-1	Mok 20	710	GTAGAGGA	510	TTCTAGCT	10	44.7	5.54
Lib 3 11-1	Mok 21A	711	GCTCATGA	511	CCTAGAGT	10	59.2	15.22
Lib 3 12-1	Mok 22	712	ATCTCAGG	512	GCGTAAGA	10	32.3	4.35
Lib 3 13-1	Mok 23	713	TAGCGAGT	513	CTATTAAG	10	42.1	3.92
Lib 3 14-1	Mok 24A	714	GTAGCTCC	514	AAGGCTAT	10	47	4.01
Lib 4 1-1	Mok 25A	715	TACTACGC	515	GAGCCTTA	10	34.9	4.03
Lib 4 2-1	Mok 26A	716	AGGCTCCG	516	TTATGCGA	10	38.6	3.87
Lib 4 3-1	Mok 27	701	TCGCCTTA	503	GTAAGGAG	10	41.6	6.10
Lib 4 4-1	Mok 28A	702	CTAGTACG	504	ACTGCATA	10	29.6	4.10
Lib 4 5-1	Mok 29A	703	TTCTGCCT	505	AAGGAGTA	10	28.1	3.80
Lib 4 6-1	Mok 30	704	GCTCAGGA	506	CTAAGCCT	10	36	3.93
Lib 4 7-1	Mok 31	705	GGA CTCT	507	CGTCTAAT	10	40.3	4.80
Lib 4 8-1	Mok 32	706	TAGGCATG	508	TCTCTCCG	10	42.1	4.45
Lib 4 9-1	Mok 33	707	CTCTCTAC	509	TCGACTAG	10	27.1	4.87
Lib 4 10-1	Mok 10B	708	CGAGGCTG	510	TTCTAGCT	10	46.9	3.90

Lib 3 15-1	NH	708	CGAGGCTG	507	CGTCTAAT	12	21.5	/
Lib 3 16-1	LK1	709	AAGAGGCA	508	TCTCTCCG	12	0.217	/
Lib 4 11-1	NH	709	AAGAGGCA	511	CCTAGAGT	12	28.5	/
Lib 4 12-1	LK2	710	GTAGAGGA	512	GCGTAAGA	12	1.09	/
PK1_13.11	PK1	701	TCGCCTTA	501	CTCTCTAT	12	0.4	/
PK2_13.11	PK2	716	AGGCTCCG	516	TTATGCGA	12	0.87	/
PK1_15.11	PK1	718	CTGCGCAT	503	GTAAGGAG	12	0.61	/
PK2_15.11	PK2	711	TCATGAGC	515	GAGCCTTA	12	0.46	/

Prilog 2

2.1. Procene srodstva *lcMLkin* programom

U uzorku sa Mokrina identifikovano je 6,191,202 pojedinačnih nukleotidnih polimorfizama čija je učestalost bila veća od 5% u databazi 1000 Evroazijskih Genoma (1000 Genomes Project Consortium et al. 2012). Za procenu srodstva *lcMLkin* programom kao referentni sistem koristile su se i populacija od interesa i savremene populacije (99 CEU individua i 503 EUR individua iz projekta 1000 genoma) (1000 Genomes Project Consortium et al. 2012; Lipatov et al. 2015; Amorim et al. 2018). Rezultati su prikazani u tabeli P2.1.

Tabela P2.1. Kompletna tabela sa svim individuama sa Mokrina i dobijenim vrednostima za $F_{ST} = 0.03$ pomoću programa *lcMLkin*. k_0 = verovatnoća da individue dele 0 alela koji su identični po poreklu, k_1 = verovatnoća da individue dele 1 alel koji su identični po poreklu, k_2 = verovatnoća da individue dele 2 alela koji su identični po poreklu. Z_0 , Z_1 , Z_2 su normalizovane vrednosti koeficijenta srodstva.

Ind. 1	Ind. 2	k_0	k_1	k_2	\hat{p}_i	Broj SNP-a	Z_0	Z_1	Z_2	\hat{p}_i	Broj SNP-a
MOK12	MOK18A	0.449	0.305	0.246	0.398	122570	0.24	0.5	0.26	0.513	78640
MOK15	MOK16A	0.306	0.629	0.065	0.379	299332	0.05	0.92	0.04	0.495	138455
MOK10B	MOK24A	0.252	0.742	0.006	0.377	251906	0.09	0.84	0.07	0.489	119083
MOK23	MOK28A	0.342	0.565	0.092	0.375	243193	0.07	0.89	0.04	0.487	115711
MOK14	MOK32	0.45	0.381	0.169	0.36	225314	0.27	0.5	0.23	0.482	111087
MOK19A	MOK22	0.753	0.224	0.024	0.135	224072	0.58	0.36	0.06	0.236	109636
MOK24A	MOK27	0.804	0.195	0	0.098	212891	0.6	0.35	0.05	0.228	107503
MOK10B	MOK27	0.835	0.13	0.035	0.1	208718	0.6	0.35	0.05	0.227	105032
MOK29A	MOK31	0.894	0.052	0.054	0.08	273587	0.69	0.28	0.03	0.166	127504
MOK20	MOK28A	0.992	0.008	0	0.004	217060	0.86	0.14	0.01	0.073	107015
MOK12	MOK17A	0.994	0.006	0	0.003	175871	0.93	0.07	0	0.036	93552
MOK17A	MOK18A	0.995	0.005	0	0.002	119667	0.95	0.05	0	0.026	78395
MOK22	MOK23	0.995	0.004	0.001	0.003	226450	0.96	0.04	0	0.019	110276
MOK21A	MOK22	0.995	0.005	0	0.002	147293	0.97	0.03	0	0.014	87459
MOK12	MOK23	0.996	0.004	0	0.002	199608	0.98	0.02	0	0.012	100099
MOK19A	MOK23	0.996	0.004	0	0.002	228078	0.98	0.02	0	0.011	110891
MOK21A	MOK23	0.996	0.004	0	0.002	149576	0.98	0.02	0	0.009	87767
MOK22	MOK28A	0.996	0.004	0	0.002	238880	0.98	0.02	0	0.009	114290
MOK18A	MOK23	0.996	0.004	0	0.002	136514	0.99	0.01	0	0.005	83372
MOK28A	MOK9B	0.996	0.004	0	0.002	250560	0.99	0.01	0	0.005	118369
MOK12	MOK15	0.997	0.003	0	0.002	229950	0.99	0.01	0	0.004	109971
MOK13	MOK25A	0.996	0.004	0	0.002	281792	0.99	0.01	0	0.004	128855

MOK13	MOK23	0.996	0.004	0	0.002	253359	0.99	0.01	0	0.003	117908
MOK18A	MOK28A	0.997	0.003	0	0.002	143827	0.99	0.01	0	0.003	85441
MOK16A	MOK26A	0.996	0.004	0	0.002	278515	1	0	0	0.002	129340
MOK17A	MOK31	0.996	0.004	0	0.002	203069	1	0	0	0.002	102408
MOK21A	MOK28A	0.996	0.004	0	0.002	157897	1	0	0	0.002	90405
MOK23	MOK30	0.996	0.004	0	0.002	229569	1	0	0	0.002	111218
MOK23	MOK33	0.996	0.004	0	0.002	236679	1	0	0	0.002	114198
MOK12	MOK16A	0.997	0.003	0	0.002	227620	1	0	0	0.001	109817
MOK12	MOK22	0.996	0.004	0	0.002	195714	1	0	0	0.001	99218
MOK12	MOK29A	0.997	0.003	0	0.002	238259	1	0	0	0.001	113919
MOK13	MOK21A	0.995	0.005	0	0.002	167519	1	0	0	0.001	92933
MOK22	MOK33	0.996	0.004	0	0.002	232415	1	0	0	0.001	113010
MOK10B	MOK12	0.997	0.003	0	0.002	206820	1	0	0	0	102450
MOK10B	MOK13	0.997	0.003	0	0.002	262130	1	0	0	0	120852
MOK10B	MOK14	0.997	0.003	0	0.002	232230	1	0	0	0	112414
MOK10B	MOK15	0.997	0.003	0	0.001	273804	1	0	0	0	126473
MOK10B	MOK16A	0.997	0.003	0	0.001	270336	1	0	0	0	125538
MOK10B	MOK17A	0.997	0.003	0	0.002	210542	1	0	0	0	105292
MOK10B	MOK18A	0.997	0.003	0	0.002	141979	1	0	0	0	84996
MOK10B	MOK19A	0.997	0.003	0	0.002	235795	1	0	0	0	113448
MOK10B	MOK20	0.996	0.004	0	0.002	213034	1	0	0	0	105279
MOK10B	MOK21A	0.996	0.004	0	0.002	155733	1	0	0	0	89548
MOK10B	MOK22	0.997	0.003	0	0.002	234276	1	0	0	0	112458
MOK10B	MOK23	0.997	0.003	0	0.001	238380	1	0	0	0	113641
MOK10B	MOK25A	0.997	0.003	0	0.002	265302	1	0	0	0	123790
MOK10B	MOK26A	0.998	0.001	0.001	0.002	254351	1	0	0	0	119521
MOK10B	MOK28A	0.997	0.003	0	0.001	251137	1	0	0	0	118096
MOK10B	MOK29A	0.997	0.002	0.001	0.002	283653	1	0	0	0	132368
MOK10B	MOK30	0.997	0.003	0	0.002	237506	1	0	0	0	113375
MOK10B	MOK31	0.997	0.003	0	0.002	237987	1	0	0	0	112487
MOK10B	MOK32	0.997	0.003	0	0.002	239355	1	0	0	0	114297
MOK10B	MOK33	0.997	0.003	0	0.002	244872	1	0	0	0	116454
MOK10B	MOK9B	0.997	0.003	0	0.002	245659	1	0	0	0	116140
MOK12	MOK13	0.996	0.004	0	0.002	221595	1	0	0	0	106483
MOK12	MOK14	0.997	0.003	0	0.002	194240	1	0	0	0	99059
MOK12	MOK19A	0.996	0.004	0	0.002	197555	1	0	0	0	100074
MOK12	MOK20	0.996	0.004	0	0.002	178245	1	0	0	0	94070
MOK12	MOK21A	0.996	0.004	0	0.002	132598	1	0	0	0	81846
MOK12	MOK24A	0.996	0.004	0	0.002	210867	1	0	0	0	104604
MOK12	MOK25A	0.996	0.004	0	0.002	222867	1	0	0	0	107861
MOK12	MOK26A	0.996	0.004	0	0.002	213011	1	0	0	0	104494
MOK12	MOK27	0.997	0.003	0	0.002	173845	1	0	0	0	93409
MOK12	MOK28A	0.996	0.003	0	0.002	210280	1	0	0	0	103393
MOK12	MOK30	0.996	0.004	0	0.002	198839	1	0	0	0	100038
MOK12	MOK31	0.996	0.004	0	0.002	199854	1	0	0	0	99724
MOK12	MOK32	0.997	0.003	0	0.002	200330	1	0	0	0	100534

MOK12	MOK33	0.996	0.004	0	0.002	204968	1	0	0	0	102208
MOK12	MOK9B	0.996	0.004	0	0.002	206038	1	0	0	0	102088
MOK13	MOK14	0.996	0.004	0	0.002	246668	1	0	0	0	116640
MOK13	MOK15	0.996	0.004	0	0.002	290771	1	0	0	0	131964
MOK13	MOK16A	0.996	0.003	0	0.002	287532	1	0	0	0	131406
MOK13	MOK17A	0.996	0.004	0	0.002	223939	1	0	0	0	108764
MOK13	MOK18A	0.996	0.004	0	0.002	153869	1	0	0	0	88507
MOK13	MOK19A	0.996	0.004	0	0.002	250791	1	0	0	0	117334
MOK13	MOK20	0.996	0.004	0	0.002	226815	1	0	0	0	108964
MOK13	MOK22	0.996	0.004	0	0.002	248776	1	0	0	0	116505
MOK13	MOK24A	0.997	0.003	0	0.002	267470	1	0	0	0	123885
MOK13	MOK26A	0.996	0.004	0	0.002	270110	1	0	0	0	124221
MOK13	MOK27	0.996	0.004	0	0.002	221325	1	0	0	0	108207
MOK13	MOK28A	0.996	0.004	0	0.002	266636	1	0	0	0	122575
MOK13	MOK29A	0.996	0.004	0	0.002	301077	1	0	0	0	138210
MOK13	MOK30	0.996	0.004	0	0.002	252307	1	0	0	0	117600
MOK13	MOK31	0.996	0.004	0	0.002	252856	1	0	0	0	117018
MOK13	MOK32	0.997	0.003	0	0.002	254070	1	0	0	0	118442
MOK13	MOK33	0.996	0.004	0	0.002	259935	1	0	0	0	121057
MOK13	MOK9B	0.996	0.004	0	0.002	261010	1	0	0	0	120519
MOK14	MOK15	0.997	0.003	0	0.002	257657	1	0	0	0	122266
MOK14	MOK16A	0.997	0.003	0	0.001	254348	1	0	0	0	120913
MOK14	MOK17A	0.997	0.003	0	0.002	198515	1	0	0	0	102124
MOK14	MOK18A	0.997	0.003	0	0.002	132408	1	0	0	0	82255
MOK14	MOK19A	0.996	0.004	0	0.002	221673	1	0	0	0	109554
MOK14	MOK20	0.997	0.003	0	0.002	200461	1	0	0	0	102390
MOK14	MOK21A	0.996	0.004	0	0.002	145639	1	0	0	0	86963
MOK14	MOK22	0.997	0.003	0	0.002	220773	1	0	0	0	109077
MOK14	MOK23	0.997	0.003	0	0.002	224319	1	0	0	0	110103
MOK14	MOK24A	0.997	0.003	0	0.002	237155	1	0	0	0	115401
MOK14	MOK25A	0.996	0.004	0	0.002	249643	1	0	0	0	119266
MOK14	MOK26A	0.996	0.003	0	0.002	239627	1	0	0	0	115797
MOK14	MOK27	0.997	0.003	0	0.002	196010	1	0	0	0	102134
MOK14	MOK28A	0.997	0.003	0	0.001	236535	1	0	0	0	114246
MOK14	MOK29A	0.997	0.003	0	0.002	267206	1	0	0	0	127708
MOK14	MOK30	0.996	0.004	0	0.002	223537	1	0	0	0	110176
MOK14	MOK31	0.996	0.004	0	0.002	223731	1	0	0	0	109023
MOK14	MOK33	0.996	0.004	0	0.002	230494	1	0	0	0	112766
MOK14	MOK9B	0.996	0.004	0	0.002	231062	1	0	0	0	112517
MOK15	MOK17A	0.997	0.003	0	0.002	234285	1	0	0	0	113682
MOK15	MOK18A	0.997	0.003	0	0.002	157729	1	0	0	0	89829
MOK15	MOK19A	0.997	0.003	0	0.002	261957	1	0	0	0	123138
MOK15	MOK20	0.996	0.004	0	0.002	236683	1	0	0	0	113794
MOK15	MOK21A	0.996	0.003	0	0.002	172902	1	0	0	0	94991
MOK15	MOK22	0.997	0.003	0	0.002	260271	1	0	0	0	122391
MOK15	MOK23	0.997	0.003	0	0.002	264625	1	0	0	0	123333

MOK15	MOK24A	0.997	0.003	0	0.001	279543	1	0	0	0	130386
MOK15	MOK25A	0.996	0.004	0	0.002	294203	1	0	0	0	135836
MOK15	MOK26A	0.997	0.003	0	0.002	282511	1	0	0	0	131161
MOK15	MOK27	0.997	0.003	0	0.001	231964	1	0	0	0	113770
MOK15	MOK28A	0.997	0.003	0	0.001	278746	1	0	0	0	129446
MOK15	MOK29A	0.997	0.003	0	0.002	314129	1	0	0	0	146832
MOK15	MOK30	0.996	0.004	0	0.002	263771	1	0	0	0	123880
MOK15	MOK31	0.996	0.004	0	0.002	264124	1	0	0	0	122377
MOK15	MOK32	0.997	0.003	0	0.002	265699	1	0	0	0	124362
MOK15	MOK33	0.996	0.004	0	0.002	271892	1	0	0	0	127506
MOK15	MOK9B	0.996	0.004	0	0.002	272709	1	0	0	0	126747
MOK16A	MOK17A	0.997	0.003	0	0.002	230954	1	0	0	0	112668
MOK16A	MOK18A	0.997	0.003	0	0.002	157428	1	0	0	0	90222
MOK16A	MOK19A	0.997	0.003	0	0.002	258494	1	0	0	0	122270
MOK16A	MOK20	0.998	0	0.002	0.002	233679	1	0	0	0	112946
MOK16A	MOK21A	0.996	0.004	0	0.002	172079	1	0	0	0	95301
MOK16A	MOK22	0.998	0.001	0.001	0.002	256695	1	0	0	0	121132
MOK16A	MOK23	0.997	0.003	0	0.002	261346	1	0	0	0	122615
MOK16A	MOK24A	0.997	0.002	0.001	0.002	275773	1	0	0	0	129237
MOK16A	MOK25A	0.997	0.003	0	0.002	290344	1	0	0	0	134762
MOK16A	MOK27	0.997	0.003	0	0.001	228485	1	0	0	0	112181
MOK16A	MOK28A	0.997	0.003	0	0.001	275109	1	0	0	0	127757
MOK16A	MOK29A	0.997	0.003	0	0.002	310130	1	0	0	0	145033
MOK16A	MOK30	0.996	0.004	0	0.002	260128	1	0	0	0	122540
MOK16A	MOK31	0.997	0.003	0	0.002	260746	1	0	0	0	121487
MOK16A	MOK32	0.997	0.003	0	0.002	262174	1	0	0	0	123191
MOK16A	MOK33	0.996	0.004	0	0.002	268127	1	0	0	0	126124
MOK16A	MOK9B	0.996	0.004	0	0.002	268926	1	0	0	0	125457
MOK17A	MOK19A	0.996	0.004	0	0.002	201442	1	0	0	0	103299
MOK17A	MOK20	0.995	0.005	0	0.002	181774	1	0	0	0	96420
MOK17A	MOK21A	0.996	0.004	0	0.002	131547	1	0	0	0	82753
MOK17A	MOK22	0.996	0.004	0	0.002	200345	1	0	0	0	102389
MOK17A	MOK23	0.997	0.003	0	0.002	203705	1	0	0	0	103330
MOK17A	MOK24A	0.997	0.003	0	0.002	215474	1	0	0	0	107593
MOK17A	MOK25A	0.996	0.004	0	0.002	226852	1	0	0	0	111218
MOK17A	MOK26A	0.996	0.004	0	0.002	217620	1	0	0	0	108359
MOK17A	MOK27	0.996	0.004	0	0.002	177994	1	0	0	0	96344
MOK17A	MOK28A	0.997	0.003	0	0.002	214786	1	0	0	0	106878
MOK17A	MOK29A	0.996	0.004	0	0.002	242890	1	0	0	0	118162
MOK17A	MOK30	0.996	0.004	0	0.002	203060	1	0	0	0	103237
MOK17A	MOK32	0.996	0.004	0	0.002	204667	1	0	0	0	103765
MOK17A	MOK33	0.996	0.004	0	0.002	209303	1	0	0	0	105475
MOK17A	MOK9B	0.996	0.004	0	0.002	210198	1	0	0	0	105424
MOK18A	MOK19A	0.997	0.003	0	0.002	135410	1	0	0	0	83268
MOK18A	MOK20	0.996	0.003	0	0.002	122080	1	0	0	0	78949
MOK18A	MOK21A	0.996	0.004	0	0.002	93593	1	0	0	0	70341

MOK18A	MOK22	0.996	0.004	0	0.002	134312	1	0	0	0	82869
MOK18A	MOK24A	0.996	0.004	0	0.002	144521	1	0	0	0	86030
MOK18A	MOK25A	0.996	0.004	0	0.002	153228	1	0	0	0	88597
MOK18A	MOK26A	0.996	0.004	0	0.002	145565	1	0	0	0	86071
MOK18A	MOK27	0.996	0.004	0	0.002	118521	1	0	0	0	78283
MOK18A	MOK29A	0.997	0.003	0	0.002	163602	1	0	0	0	92094
MOK18A	MOK30	0.996	0.004	0	0.002	135830	1	0	0	0	83226
MOK18A	MOK31	0.997	0.003	0	0.002	137194	1	0	0	0	83408
MOK18A	MOK32	0.997	0.003	0	0.002	136417	1	0	0	0	83479
MOK18A	MOK33	0.996	0.004	0	0.002	139729	1	0	0	0	84541
MOK18A	MOK9B	0.996	0.004	0	0.002	141001	1	0	0	0	84546
MOK19A	MOK20	0.996	0.004	0	0.002	203503	1	0	0	0	102876
MOK19A	MOK21A	0.998	0	0.002	0.002	148532	1	0	0	0	87862
MOK19A	MOK24A	0.997	0.003	0	0.002	240763	1	0	0	0	116055
MOK19A	MOK25A	0.996	0.004	0	0.002	253609	1	0	0	0	120316
MOK19A	MOK26A	0.996	0.004	0	0.002	243447	1	0	0	0	116524
MOK19A	MOK27	0.997	0.003	0	0.002	199278	1	0	0	0	102727
MOK19A	MOK28A	0.997	0.003	0	0.002	240509	1	0	0	0	115272
MOK19A	MOK29A	0.996	0.004	0	0.002	271406	1	0	0	0	128854
MOK19A	MOK30	0.996	0.004	0	0.002	227332	1	0	0	0	110671
MOK19A	MOK31	0.996	0.004	0	0.002	227285	1	0	0	0	109675
MOK19A	MOK32	0.996	0.004	0	0.002	228957	1	0	0	0	111389
MOK19A	MOK33	0.996	0.004	0	0.002	234035	1	0	0	0	113810
MOK19A	MOK9B	0.996	0.004	0	0.002	234687	1	0	0	0	112969
MOK20	MOK21A	0.996	0.004	0	0.002	133650	1	0	0	0	82949
MOK20	MOK22	0.996	0.004	0	0.002	202287	1	0	0	0	102385
MOK20	MOK23	0.997	0.003	0	0.002	205847	1	0	0	0	103401
MOK20	MOK24A	0.997	0.003	0	0.002	217446	1	0	0	0	107822
MOK20	MOK25A	0.996	0.004	0	0.002	229320	1	0	0	0	111456
MOK20	MOK26A	0.995	0.004	0	0.002	220114	1	0	0	0	108273
MOK20	MOK27	0.997	0.003	0	0.002	179465	1	0	0	0	96203
MOK20	MOK29A	0.996	0.004	0	0.002	245339	1	0	0	0	118295
MOK20	MOK30	0.995	0.004	0	0.002	205109	1	0	0	0	102923
MOK20	MOK31	0.996	0.004	0	0.002	205333	1	0	0	0	102457
MOK20	MOK32	0.996	0.004	0	0.002	206439	1	0	0	0	103975
MOK20	MOK33	0.996	0.004	0	0.002	211584	1	0	0	0	105578
MOK20	MOK9B	0.996	0.004	0	0.002	212351	1	0	0	0	105152
MOK21A	MOK24A	0.997	0.003	0	0.002	158436	1	0	0	0	91014
MOK21A	MOK25A	0.996	0.004	0	0.002	167895	1	0	0	0	93688
MOK21A	MOK26A	0.995	0.005	0	0.003	159782	1	0	0	0	91095
MOK21A	MOK27	0.998	0.001	0.002	0.002	130302	1	0	0	0	82411
MOK21A	MOK29A	0.996	0.004	0	0.002	179350	1	0	0	0	98087
MOK21A	MOK30	0.996	0.004	0	0.002	148771	1	0	0	0	87891
MOK21A	MOK31	0.996	0.004	0	0.002	150015	1	0	0	0	87524
MOK21A	MOK32	0.996	0.004	0	0.002	149940	1	0	0	0	87931
MOK21A	MOK33	0.995	0.005	0	0.002	153828	1	0	0	0	89222

MOK21A	MOK9B	0.996	0.004	0	0.002	154445	1	0	0	0	89456
MOK22	MOK24A	0.997	0.003	0	0.002	239443	1	0	0	0	115184
MOK22	MOK25A	0.996	0.004	0	0.002	252050	1	0	0	0	119522
MOK22	MOK26A	0.996	0.003	0.001	0.002	242104	1	0	0	0	115691
MOK22	MOK27	0.996	0.004	0	0.002	197826	1	0	0	0	101996
MOK22	MOK29A	0.996	0.003	0	0.002	269796	1	0	0	0	127501
MOK22	MOK30	0.996	0.004	0	0.002	225664	1	0	0	0	109882
MOK22	MOK31	0.997	0.001	0.001	0.002	226207	1	0	0	0	109250
MOK22	MOK32	0.997	0.003	0	0.002	227679	1	0	0	0	110841
MOK22	MOK9B	0.996	0.004	0	0.002	233379	1	0	0	0	112666
MOK23	MOK24A	0.997	0.003	0	0.002	243325	1	0	0	0	116560
MOK23	MOK25A	0.996	0.004	0	0.002	256445	1	0	0	0	120846
MOK23	MOK26A	0.997	0.003	0	0.002	246267	1	0	0	0	116871
MOK23	MOK27	0.997	0.003	0	0.002	201433	1	0	0	0	103125
MOK23	MOK29A	0.997	0.003	0	0.002	274308	1	0	0	0	129286
MOK23	MOK31	0.997	0.003	0	0.002	229948	1	0	0	0	110123
MOK23	MOK32	0.997	0.003	0	0.002	231544	1	0	0	0	112105
MOK23	MOK9B	0.996	0.004	0	0.002	237477	1	0	0	0	113838
MOK24A	MOK25A	0.997	0.003	0	0.002	270743	1	0	0	0	127213
MOK24A	MOK26A	0.997	0.003	0	0.002	259957	1	0	0	0	123137
MOK24A	MOK28A	0.997	0.003	0	0.002	256681	1	0	0	0	121401
MOK24A	MOK29A	0.997	0.003	0	0.002	289565	1	0	0	0	136910
MOK24A	MOK30	0.997	0.003	0	0.002	242844	1	0	0	0	116868
MOK24A	MOK31	0.997	0.003	0	0.002	242971	1	0	0	0	115256
MOK24A	MOK32	0.997	0.003	0	0.001	244457	1	0	0	0	117440
MOK24A	MOK33	0.997	0.003	0	0.002	250224	1	0	0	0	119751
MOK24A	MOK9B	0.997	0.003	0	0.002	251017	1	0	0	0	119241
MOK25A	MOK26A	0.996	0.003	0.001	0.002	273726	1	0	0	0	127747
MOK25A	MOK27	0.996	0.004	0	0.002	224409	1	0	0	0	110881
MOK25A	MOK28A	0.998	0.001	0.001	0.002	270118	1	0	0	0	125902
MOK25A	MOK29A	0.996	0.004	0	0.002	304711	1	0	0	0	142835
MOK25A	MOK30	0.997	0.002	0.001	0.002	255587	1	0	0	0	120626
MOK25A	MOK31	0.996	0.004	0	0.002	255982	1	0	0	0	119732
MOK25A	MOK32	0.996	0.004	0	0.002	257473	1	0	0	0	121463
MOK25A	MOK33	0.996	0.004	0	0.002	263280	1	0	0	0	124117
MOK25A	MOK9B	0.996	0.004	0	0.002	264284	1	0	0	0	123571
MOK26A	MOK27	0.996	0.004	0	0.002	215544	1	0	0	0	107882
MOK26A	MOK28A	0.997	0.003	0	0.002	259468	1	0	0	0	121848
MOK26A	MOK29A	0.996	0.004	0	0.002	292633	1	0	0	0	137421
MOK26A	MOK30	0.996	0.004	0	0.002	245427	1	0	0	0	116998
MOK26A	MOK31	0.996	0.004	0	0.002	245563	1	0	0	0	115819
MOK26A	MOK32	0.997	0.003	0	0.002	247137	1	0	0	0	117737
MOK26A	MOK33	0.996	0.004	0	0.002	253015	1	0	0	0	120364
MOK26A	MOK9B	0.996	0.004	0	0.002	253568	1	0	0	0	119360
MOK27	MOK28A	0.997	0.003	0	0.002	212629	1	0	0	0	106868
MOK27	MOK29A	0.997	0.003	0	0.002	240430	1	0	0	0	118104

MOK27	MOK30	0.996	0.004	0	0.002	200536	1	0	0	0	103032
MOK27	MOK31	0.996	0.004	0	0.002	200739	1	0	0	0	102078
MOK27	MOK32	0.997	0.003	0	0.002	202397	1	0	0	0	103677
MOK27	MOK33	0.996	0.004	0	0.002	207235	1	0	0	0	105481
MOK27	MOK9B	0.997	0.003	0	0.002	207640	1	0	0	0	105174
MOK28A	MOK29A	0.997	0.003	0	0.002	288967	1	0	0	0	135336
MOK28A	MOK30	0.996	0.003	0	0.002	242083	1	0	0	0	115615
MOK28A	MOK31	0.996	0.004	0	0.002	242362	1	0	0	0	114372
MOK28A	MOK32	0.997	0.003	0	0.002	244133	1	0	0	0	116321
MOK28A	MOK33	0.996	0.004	0	0.002	249371	1	0	0	0	118886
MOK29A	MOK30	0.996	0.004	0	0.002	273298	1	0	0	0	129429
MOK29A	MOK32	0.997	0.003	0	0.002	275401	1	0	0	0	130265
MOK29A	MOK33	0.996	0.004	0	0.002	281841	1	0	0	0	133144
MOK29A	MOK9B	0.996	0.004	0	0.002	282564	1	0	0	0	132320
MOK30	MOK31	0.996	0.003	0.001	0.002	229037	1	0	0	0	109973
MOK30	MOK32	0.996	0.004	0	0.002	230767	1	0	0	0	111737
MOK30	MOK33	0.996	0.004	0	0.002	236108	1	0	0	0	114042
MOK30	MOK9B	0.996	0.004	0	0.002	236619	1	0	0	0	113347
MOK31	MOK32	0.996	0.004	0	0.002	230753	1	0	0	0	110800
MOK31	MOK33	0.996	0.004	0	0.002	235946	1	0	0	0	112670
MOK31	MOK9B	0.996	0.004	0	0.002	236926	1	0	0	0	112545
MOK32	MOK33	0.996	0.004	0	0.002	237952	1	0	0	0	114658
MOK32	MOK9B	0.996	0.004	0	0.002	238533	1	0	0	0	114431
MOK33	MOK9B	0.997	0.001	0.002	0.002	243724	1	0	0	0	116500

Biografija

Aleksandra M. Žegarac je rođena 1.09.1985. godine u Beogradu. Nakon završenih osnovnih i master studija na Biološkom fakultetu u Beogradu (smer Molekularna biologija i fiziologija) 2012. godine, sa prosečnom ocenom 8.85, dobila je stipendiju za Erasmus Mundus master program (Archeological Material Science - ARCHMAT) na univerzitetima u Evori, Solunu i Rimu. U okviru svog master rada, Aleksandra je radila na analizi drevne mitohondrijske DNK primenom metode Nove generacije sekvenciranja u Laboratoriji za antropologiju na Univerzitetu u Firenci 2015. godine. Nakon toga, upisuje doktorske studije na Odeljenju za Evolucionu biologiju na Biološkom fakultetu u Beogradu pod mentorstvom profesorke Biljane Stojković i profesorke Sofije Stefanović. Od 2018. godine zaposlena je u Laboratoriji za bioarheologiju na Filozofskom fakultetu u Beogradu na projektu Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije "Bioarheologija drevne Evrope – ljudi, životinje i biljke u praistoriji Srbije". 2018. godine dobila je stipendiju *Wenner-Gren* fondacije, a potom i DAAD stipendiju za kratkoročni projekat koje su omogućile izolovanje, sekvenciranje i obradu genoma iz skeletnih ostataka sa nekropole u Mokrinu na odeljenju za antropologiju Johannes Gutenberg Univerziteta u Majncu. Takođe je radila na analizi uzoraka sa Đerdapa u okviru projekata BIRTH i FEMFERT, kao i na projektu EvolEdge. Do sada je objavila dva naučna rada u časopisima od međunarodnog značaja, tri rada u nacionalnim časopisima, a rezultate je prezentovala na 4 nacionalne i međunarodne konferencije. Od 2023. godine zaposlena je na Institutu BioSens, na Univerzitetu u Novom Sadu.

Додатак 1.

Изјава о ауторству

Потписан-а **Жегарац М. Александра**

Број индекса: **Б3028/2016**

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Анализа древне ДНК из узорака некрополе Мокрин (2100 – 1800 п.н.е.):
реконструкција биолошког средства у контексту друштвене структуре
бронзанодопске популације**

- о резултат сопственог истраживачког рада,
- о да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- о да су резултати коректно наведени и
- о да нисам кршио/ла ауторака права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 23.05.2023.

Додатак 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије
докторског рада**

Име и презиме аутора **Жегарац М. Александра**

Број индекса **Б3028/2016**

Студијски програм **Биологија, Еволуциона биологија**

Наслов рада **Анализа древне ДНК из узорака некрополе Мокрин (2100 – 1800 п.н.е.): реконструкција биолошког сродства у контексту друштвене структуре бронзанодопске популације**

Ментор **др Биљана Стојковић, др Софија Стефановић**

Потписан-а **Жегарац М. Александра**

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име, презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 23.05.2023.

Додатак 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић” да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Анализа древне ДНК из узорака некрополе Мокрин (2100 – 1800 п.н.е.): реконструкција биолошког сродства у контексту друштвене структуре бронзанодопске популације

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци је саставни део изјаве).

Потпис докторанда

У Београду, 23.05.2023.

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.