

**UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI**  
**FACULTATEA DE BIOLOGIE ȘI GEOLOGIE**  
**ȘCOALA DOCTORALĂ BIOLOGIE INTEGRATIVĂ**

---

**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

# **Ereditate maternă în populații istorice la porțile Europei**



---

**Doctorand: Ioana RUSU**

---

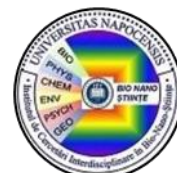
**Conducător științific: Prof. Dr. Horia Leonard BANCIU**

---

**CLUJ-NAPOCA, 2019**



**UNIVERSITATEA  
BABEȘ-BOLYAI**



---

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

# Ereditate maternă în populații istorice la porțile Europei

---

Doctorand: Ioana RUSU

---

Conducător științific: Prof. Dr. Horia Leonard BANCIU

---

## Cuprins

<b>Lista abrevierilor</b> .....	<b>1</b>
<b>Introducere</b> .....	<b>5</b>
<b>I. ADN vechi: instrument de cercetare folosit pentru a dezvălui trecutul populației umane</b>	<b>6</b>
1. Scurt istoric .....	6
1.1. Primele secvențe de ADN vechi.....	7
1.2. Progresul metodologic și studii cheie.....	7
2. Caracteristicile ADN-ului și dificultățile asociate .....	11
2.1. Conservarea ADN și modificările <i>post-mortem</i> .....	11
2.2. Contaminarea și autentificarea rezultatelor.....	14
3. ADNmt ca sistem genetic utilizat în studiul istoriei populației umane.....	17
3.1. Proprietățile ADN-ului mitocondrial .....	18
3.2. Variații ale secvenței ADNmt în populația umană.....	19
3.3. Metode de analiză a ADN-ului mitocondrial .....	20
3.3.1. Amplificarea și secvențializarea Sanger a regiunilor hipervariabile.....	21
3.3.2. Secvențializarea de nouă generație a întregului genom mitocondrial.....	22
4. Istoria Europei reflectată de studii de ADN vechi .....	25
4.1. Conexiuni genetice în Epoca Bronzului.....	25
4.2. Genetica populațiilor din perioada medievală.....	26
4.3. Genomuri moderne și antice din teritoriul actual al României .....	27
<b>II. Scopul studiului</b> .....	<b>30</b>
<b>III. Materiale și metode</b> .....	<b>31</b>
1. Situri arheologice și informații privind probele analizate .....	31
2. Analize de antropologie fizică.....	35
2.1. Determinarea profilului biologic .....	35
2.2. Evaluarea condițiilor patologice și a leziunilor traumatice .....	36
3. Analiza moleculară a ADN-ului vechi .....	36
3.1. Metoda clasică pentru reconstruirea regiunilor hipervariabile ale genomului mitocondrial .....	38
3.1.1. Pregătirea probelor .....	38
3.1.2. Extracția standard de ADN .....	38
3.1.3. Extracția simultană de ADN-proteine .....	39
3.1.4. Amplificarea segmentelor hipervariabile (HVS) .....	40
3.1.5. Clonarea și secvențializarea ADN.....	42
3.1.6. Criterii de autentificare.....	43
3.2. Secvențializarea de nouă generație .....	44
3.2.1. Extracția ADN și construirea bibliotecilor de ADN .....	44
3.2.2. Capturarea secvențelor de ADN mitocondrial și secvențializare.....	47

3.2.3. Analiza bioinformatică a secvențelor brute.....	49
4. Analize comparative folosind date de ADNmt din literatură.....	50
4.1. Secvențe moderne și vechi de ADNmt folosite în analizele comparative .....	50
4.1.1. Analize de genetica populațiilor.....	52
4.1.2. Analiza filogenetică și filogeografică .....	54
<b>IV. Rezultate și discuții .....</b>	<b>55</b>
1. Ereditate maternă în populația medievală de la Capidava .....	55
1.1. Contextul arheologic .....	57
1.2. Profilul biologic, patologie, traume .....	61
1.3. Diversitatea genetică în rândul indivizilor înmormântați după ritual creștin, reflectată de regiunea de control a genomului mitocondrial.....	66
1.3.1. Autentificarea rezultatelor.....	66
1.3.2. Haplogrupuri mitocondriale și relațiile dintre indivizi.....	72
1.3.3. Conexiuni genetice cu alte populații medievale.....	73
1.3.4. Legături genetice cu populații moderne .....	78
1.4. Profilul genetic reflectat de secvența întregului genom mitocondrial.....	82
1.4.1. Rezultatele procesării bioinformaticice a datelor brute .....	83
1.4.2. Rafinarea încadrării în haplogrup a indivizilor creștini .....	86
1.4.3. Diversitatea haplogrupurilor mitocondriale în rândul indivizilor din groapa comună (complex C58) .....	88
1.4.4. Distribuția geografică și relațiile filogenetice pentru liniile maternale identificate în rândul indivizilor din groapa comună .....	90
1.4.5. Relații genetice ale populației medievale de la Capidava cu alte populații vechi... 97	
1.5. Influențe genetice și posibilele origini geografice ale indivizilor studiați .....	99
2. Liniile mitocondriale la indivizii de Epoca Bronzului și premoderni din situl arheologic Mireasa .....	101
2.1. Contextul arheologic și datarea cu radiocarbon .....	102
2.2. Analiza osteologică .....	104
2.3. Tipare ale polimorfismelor la nivelul regiunii de control mitocondriale .....	106
2.3.1. Cele mai probabile haplogrupuri mitocondriale ale indivizilor de Epoca Bronzului analizați .....	107
2.3.2. Haplogrupurile mitocondriale ale probelor pre-moderne.....	110
2.4. Profilul mitocondrial complet al indivizilor de Epoca Bronzului .....	111
2.4.1. Rezultatul analizei bioinformaticice .....	112
2.4.2. Relații filogenetice și filogeografice .....	112
<b>V. Concluzii și perspective.....</b>	<b>116</b>
<b>Materiale suplimentare.....</b>	<b>119</b>
<b>Appendix I. Populații medievale (Set de date I) utilizate în analiza comparativă pe baza HVS-I a indivizilor medievali creștini de la Capidava.....</b>	<b>119</b>
Appendix I.1. Informații cu privire la populațiile identificate în literatură.....	119

Appendix I.2. Bibliografie .....	120
Appendix I.3. Frecvența haplogrupurilor mitocondriale.....	121
Appendix I.4. Valorile $F_{ST}$ și valorile semnificative p (verde) .....	122
Appendix I.5. Matricea valorilor Slatkin $F_{ST}$ .....	123
Appendix I.6. Valorile absolute ale haplotipurilor comune .....	124
<b>Appendix II. Populații moderne eurasiatice (Set de date II) utilizate în analiza comparativă pe baza HVS-I a indivizilor medievali creștini de la Capidava.....</b>	<b>125</b>
Appendix II.1. Informații cu privire la populațiile identificate în literatură .....	125
Appendix II.2. Bibliografie .....	127
Appendix II.3. Frecvența haplogrupurilor mitocondriale .....	130
Appendix II.4. Valorile $F_{ST}$ și valorile semnificative p (verde) .....	131
Appendix II.5. Matricea valorilor Slatkin $F_{ST}$ .....	133
<b>Appendix III. Secvențe mitocondriale complete utilizate în rețelele filogenetice (Set de date III).....</b>	<b>135</b>
Appendix III.1. Genomurile mitocondriale complete publicate în bazele de date și folosite în analiza filogenetică a indivizilor din groapa comună de la Capidava (C58).....	135
Appendix III.2. Bibliografie.....	142
Appendix III.3. Genomurile mitocondriale complete publicate în bazele de date și folosite în analiza filogenetică a indivizilor de Epoca Bronzului de la Mireasa.....	146
Appendix III.4. Bibliografie.....	148
<b>Appendix IV. Populații istorice (Set de date IV) utilizate în analiza comparativă pe baza întregului genom mitocondrial a indivizilor medievali de la Capidava .....</b>	<b>150</b>
Appendix IV.1. Descrierea probelor .....	150
Appendix IV.2. Bibliografie.....	163
Appendix IV.3. Valorile $F_{ST}$ și valorile semnificative p (verde) .....	164
Appendix IV.4. Matricea valorilor Slatkin $F_{ST}$ .....	165
<b>Bibliografie.....</b>	<b>166</b>
<b>Lista de imagini .....</b>	<b>180</b>
<b>Lista de tabele.....</b>	<b>183</b>
<b>Mulțumiri.....</b>	<b>184</b>
<b>Performanța științifică (lucrări publicate).....</b>	<b>186</b>
Lista lucrărilor științifice incluse în teză .....	186
Lista lucrărilor științifice neincluse în teză .....	186
Lista participărilor la conferințe .....	186

## Lista abrevierilor

ADN	Acid dezoxiribonucleic
ADNa	ADN antic/vechi
ADNmt	ADN mitocondrial
bp	Perechi de baze
BSA	Albumină serică bovină
CTAB	Bromură de cetil-trimetil-amoniu
HC	<i>Clustering</i> ierarhic
HTS	Secvențializare ADN <i>High-Throughput</i>
HVS-I	Regiunea Hipervariabilă I
HVS-II	Regiunea Hipervariabilă II
MRCA	Cel mai recent strămoș comun
NGS	Secvențializarea de nouă generație
np	Poziția nucleotidelor
PCA	Analiza componentelor principale
PCR	Reacția în lanț a polimerazei
PCs	Componenetele principale
PTB	“ <i>N-phenacylthiazolium bromide</i> ”
rCRS	Secvența de referință Cambridge revizuită (ADNmt)
RFLP	Polimorfismul lungimii fragmentelor de restricție
RSRS	Secvența de referință <i>Sapiens</i> reconstruită
SHA	Analiza haplotipului comun
SNP	Polimorfism uninucleotidic

### Cuvinte cheie

ADN vechi, haplogrup mitocondrial, extracție duală ADN-proteine, secvențializarea de nouă generație, diversitate genetică, genetica populațiilor umane

## **Introducere**

Aspecte legate de originea omului, trecutul său evolutiv, precum și istoria populațiilor au stârnit curiozitatea de milenii. Genomul populației umane este modelat în mod continuu de evenimente demografice majore și, din moment ce amprentele genetice sunt moștenite de la generațiile anterioare, o dovadă constantă a trecutului este reprezentată de materialul genetic uman actual. Prin urmare, studiul variației genetice umane reprezintă un instrument util pentru evaluarea tiparelor de migrație, a influențelor determinate de amestecul populațiilor asupra fondului genetic și pentru determinarea originii populațiilor. Schimbările demografice recente au, de asemenea, o influență asupra fondului genetic uman actual și pot masca impactul unor evenimente mai vechi. Din acest motiv, accesul direct la moleculele de ADN conservate în resturile fosile sau arheologice oferă informații valoroase pentru o mai bună înțelegere a istoriei genetice a populațiilor umane.

### **I. ADN vechi: instrument de cercetare folosit pentru a dezvălui trecutul populației umane**

Studiul ADN-ului antic a început să se contureze ca domeniu de cercetare în anii '80 și a suferit transformări impresionante de-a lungul timpului. Primele studii de ADN vechi s-au axat, în general, pe analiza fragmentelor genomice extranucleare (ADN mitocondrial și/sau cloroplastidian) care sunt mai numeroase într-o celulă decât fragmentele de ADN nuclear. Acest aspect facilitează recuperarea materialului genetic și permite replicarea satisfăcătoare a rezultatelor. Datorită îmbunătățirilor tehnice din ultimul deceniu (secvențierea masivă paralelă, însoțită de o creștere a puterii de calcul), a fost posibilă recuperarea și analizarea secvențelor nucleare de ADN cu o mai mare regularitate (Linderholm, 2016). În același timp, domeniul a progresat de la analiza a câtorva sute de perechi de baze (pb) la analiza a sute de milioane de perechi de baze, o schimbare tehnologică care a permis aprofundarea cunoștințelor despre istoria genetică a omului (și a celor mai apropiate forme înrudite) (Slatkin și Racimo, 2016).

#### **1. Scurt istoric**

În decursul ultimilor 30 de ani au fost publicate din ce în ce mai multe studii de ADN vechi ce au încercat să răspundă la o gamă variată de întrebări legate de evoluția și genetica populației umane cu scopul de a reconstrui trecutul istoric.

##### **1.1. Primele secvențe de ADN vechi**

Domeniul de cercetare al ADN-ului vechi datează din 1984, când Higuchi și colab. (1984) au reușit pentru prima dată să izoleze molecule de ADN dintr-un specimen muzeal, vechi de 140 de ani, ce aparținea unui membru dispărut din genul *Equus*, o specie înrudită cu calul și zebra. Pe lângă faptul că în acest studiu s-a demonstrat că moleculele ADN pot fi conservate și

recuperate din speciile antice, importanța acestui studiu seminal constă în faptul că a scos în evidență posibilitatea utilizării moleculelor de ADN vechi pentru a clarifica relațiile filogenetice ale speciilor dispărute, deoarece rezultatele de ADNmt au arătat că quagga a fost mai strâns înrudită cu zebra comună decât cu calul (Higuchi și colab., 1984; Stoneking, 2016).

Un an mai târziu, Paabo (1985) a secvențializat și a clonat un fragment de ADN uman cu o lungime de 3,4 kpb, provenit de la o mumie egipteană, veche de aproximativ 2400 de ani. Cercetările ulterioare (Paabo și Wilson, 1988) au atras atenția asupra uneia dintre cele mai mari probleme asociate studiilor de ADN vechi, contaminarea, și este acum acceptat că primele date genetice obținute de la mumia egipteană, menționată mai sus, au fost rezultatele contaminării cu ADN exogen.

## 1.2. Progresul metodologic și studii cheie

Domeniul de cercetare al ADN a progresat rapid odată cu dezvoltarea tehnicii cunoscută sub numele de reacția în lanț a polimerazei sau PCR (Mullis și Faloona, 1987). Datele genetice antice obținute prin PCR au fost folosite pentru a analiza o gamă variată de specii, cu o distribuție geografică și geografică largă, pentru a lămuri anumite aspecte biologice: procese filogenetice și evolutive, istoria populațiilor și filogeografie, dietă și comportamente, domesticirea anumitor specii (Hofreiter și colab., 2001; Paabo și colab., 2004; Paijmans și colab., 2013). Spre sfârșitul anului 2000 s-a dovedit că multe din secvențele ADN raportate anterior (de ex. cele ale insectelor păstrate în cihlimbar) nu au putut fi reproduse (Austin și colab., 1997), în timp ce altele (de ex. cele din oase de dinozaur) s-au dovedit a fi rezultatul contaminării cu ADN exogen (Young și colab., 1995). Aceste studii de început au demonstrat dificultatea evitării contaminării atunci când se lucrează cu ADN.

Aproape toate limitările asociate cu tehnica PCR cuplată cu secvențializarea tradițională Sanger au fost depășite în prima decadă a secolului XX, după apariția tehnologiilor NGS (Margulies și colab., 2005). Dezvoltarea NGS a deschis calea pentru optimizarea altor procedee cu implicații cruciale pentru bioarheologia moleculară, cum ar fi extracția ADN și selecția fragmentelor de interes (*target enrichment*) (Hofreiter și colab., 2015). Numărul mare de secvențe de date generate prin NGS au stimulat, totodată, dezvoltarea instrumentelor bioinformatiche necesare pentru reconstrucția secvențelor originale pornind de la secvențele brute.

Folosind NGS, au fost obținute mai multe informații despre evoluția omului și despre relațiile dintre omul anatomic modern și alte subspecii arhaice (Fu și colab., 2015; Hajdinjak și colab., 2018; Reich și colab., 2010), cu potențialul ca alte secrete genetice ale mai multor specimene antice vor fi descifrate cu succes. De exemplu, studiile ample, bazate pe zeci sau mii



de probe vechi, focalizate pe diferite perioade istorice, oferă o imagine mai clară a istoriei populației umane din zona Eurasiatică (Allentoft și colab., 2015; Damgaard și colab., 2018; Mathieson și colab., 2018; Mathieson și colab., 2015; Neparaczki și colab., 2018; Stolarek și colab., 2018; Tassi și colab., 2017; Wang și colab., 2018).

Chiar dacă tehnica NGS a revoluționat domeniul bioarheologiei moleculare, aceasta este în continuă dezvoltare, deoarece încă există loc de îmbunătățiri.

## **2. Caracteristicile ADN și dificultățile asociate**

Spre deosebire de studiile de ADN modern, cele de ADN vechi întâmpină o serie de probleme metodologice specifice domeniului, datorate proprietăților pe care moleculele de ADN din resturi arheologice o au. Principala dificultate este generarea unui număr suficient de autentice secvențe de ADN pentru a face un studiu concludent (Gilbert și colab., 2005)

### **2.1. DNA preservation and *post-mortem* modifications**

După ce organismul devine inactiv, procesele de reparare celulară încetează și, astfel, leziunile ADN se acumulează progresiv. În plus, compartimentele celulare încep să se dezintegreze și, drept consecință, moleculele de ADN devin expuse efectelor intense ale diferiților factori care le afectează stabilitatea și pot cauza pierderea ADN-ului recuperabil. În afară de scăderea cantității totale de ADN conservat în probele antice, pot apărea diferite forme de deteriorare a ADN-ului (rupturi ale catenelor, leziuni oxidative, ADN *crosslinks* și leziuni hidrolitice). De exemplu, fragmentarea ADN limitează lungimea secvențelor ADN care pot fi amplificate prin PCR, unele leziuni blochează activitatea ADN polimerazei, altele cauzează încorporarea unor baze incorecte în timpul PCR. Toate acestea provoacă impedimente în etapele experimentale necesare pentru recuperarea și procesarea ADN (Dabney și colab., 2013b).

Pe lângă procesele chimice care afectează structura ADN-ului și gradul lui de conservare după moartea organismelor, mediul de depozitare (umiditate, temperatură, salinitate și pH) joacă un rol important în progresul degradării (Dabney și colab., 2013b). Supraviețuirea ADN-ului este favorizată în anumite circumstanțe cum ar fi regiunile de permafrost sau zonele în care rămășițele sunt deshidratate imediat după deces (Orlando și colab., 2013; Willerslev și colab., 2007). Ratele de degradare a ADN-ului diferă în funcție de tipul de țesut. Țesuturile minerale (oase și dinți) sunt predominant utilizate ca sursă de izolare a ADN-ului, deoarece adsorbția ADN-ului la fracțiunea anorganică a hidroxiapatitei încetinește rata degradării și datorită ubicuității lor în înregistrările arheologice și paleontologice (Campos și colab., 2012; Lindahl, 1993).

## **2.2. Contaminarea și autentificarea rezultatelor**

Contaminarea este una dintre cele mai serioase inconveniente în studiile ADN vechi, în special în analize de ADN uman din cauza relației evolutive strânse dintre resturile umane arheologice și omul modern care le manipulează, începând de la săpăturile arheologice până la diferitele experimente de laborator (Kirsanow și Burger, 2012). Problema contaminării este de fapt o problemă de abundență relativă între ADN endogen și exogen. Chiar și în probele arheologice bine conservate, cantitatea de ADN amplificabil este semnificativ mai mică (de mii de ori) decât potențialele molecule contaminante din mediu (de exemplu, picături de aerosoli) (Willerslev și Cooper, 2005). Contaminarea modernă umană este cea mai insidioasă, dar există și alte două forme de contaminare care pot afecta analiza ADN: substanțele inhibitoare co-extrase și ADN-ul microbial din mediu (Stoneking, 2016).

În timpul experimentelor de laborator, cea mai mare sursă potențială de contaminare asociată cu metodele bazate pe PCR este reprezentată de producții de amplificare din experimentele anterioare (Deguilloux și colab., 2011; Kirsanow și Burger, 2012). Prin urmare, au fost descrise și utilizate strategii standard pentru a evita, minimiza și detecta contaminarea (Cooper și Poinar, 2000; Paabo și colab., 2004; Poinar, 2003). Cele mai importante criterii utilizate pentru a asigura autenticitatea ADN includ: i) procesarea probelor în cameră curată, izolată fizic și dedicată analizei ADN; ii) utilizarea controalelor negative; iii) reproductibilitatea rezultatelor și replicarea independentă; iv) clonarea și secvențializarea produșilor PCR; v) testarea comportamentului molecular; vi) cuantificarea; vii) sens filogenetic.

În cazul secvențelor obținute prin NGS, se pot utiliza metode computaționale pentru a identifica tiparele caracteristice ale degradării ADN cu scopul de a evalua autenticitatea rezultatelor, ceea ce elimină necesitatea replicării rezultatelor (Linderholm, 2016). Cu toate acestea, contaminarea cu ADN exogen rămâne o problemă centrală în studiile de ADN vechi, datorită sensibilității limitate a metodelor computaționale și a posibilității contaminării încrucișate între probe (Llamas și colab., 2017).

## **3. ADNmt ca sistem genetic utilizat în studiul istoriei populației umane**

De la apariția domeniului de cercetare a ADN-ului vechi, preferința pentru o anumită regiune genomică a fost determinată de disponibilitatea și progresul tehnologiei necesare pentru a analiza și a interpreta datele genetice. Cel mai frecvent utilizat sistem genetic pentru evaluarea diversității moleculare a populațiilor umane istorice a fost ADN-ul mitocondrial, datorită unei combinații de proprietăți particulare și din considerente practice (Galtier și colab., 2009).

### **3.1. Proprietățile ADN-ului mitocondrial**

Mitocondria, organit citoplasmatic responsabil de producerea energiei celulare, are un genom mic, independent de cel nuclear (replicarea autonomă) (Schatz și colab., 1964). Spre deosebire de ADN-ul nuclear, cromosomul mitocondrial este organizat ca o moleculă circulară dublu-catenară, asemănătoare genomului bacterian. Secvența completă a genomului mitocondrial uman are 16569 perechi de baze și conține 37 de gene implicate în respirația celulară, principala funcție a mitocondriilor (Anderson și colab., 1981). Pe lângă regiunea de codificare, ADNmt include un fragment de aproximativ 1100 bp, denumit regiune de control, deoarece are în principal funcții de reglare. ADN-ul mitocondrial uman a fost utilizat extensiv ca marker molecular pentru studiul evoluției umane și a migrațiilor populațiilor umane, datorită caracteristicilor sale particulare care îl fac adecvat pentru astfel de studii: numărul ridicat de copii, moștenirea pe linie maternă, lipsa recombinării și rata mutațională mare (Kivisild, 2015).

### **3.2. Variații ale secvenței ADNmt în populația umană**

Istoria evenimentelor mutaționale poate fi reconstruită și vizualizată cu ajutorul arborilor filogenetici care ilustrează relațiile evolutive dintre secvențele de ADN ale unei populații sau ale unei specii. Liniile înrudite de ADNmt, care au același set de polimorfisme (mutații de diagnostic), sunt grupate în haplogrupuri care au evoluat din același strămoș comun, și reprezintă astfel, puncte majore de ramificație în arborele filogenetic mitocondrial. Cele mai comune ramuri ale arborelui filogenetic mitocondrial au fost etichetate cu litere ale alfabetului latin (Torrioni și colab., 1993). Primele haplogrupuri mitocondriale au fost notate cu literele A, B și C și au fost atribuite variației genetice din rândul americanilor nativi (Torrioni și colab., 1993). Literele H-K sunt asociate cu linii mitocondriale europene (Torrioni și colab., 1994), în timp ce cel mai vechi haplogrup mitocondrial, regăsit în Africa, este numit L (Chen și colab., 1995). Acumularea rapidă a secvențelor complete de ADNmt din diferite populații umane a dus la construirea și, ulterior, actualizarea arborelui filogenetic mitocondrial uman (van Oven și Kayser, 2009). Arborele mitocondrial utilizat în prezent (*mtDNA tree Build 17*: <http://www.phylotree.org/>) are o structură robustă și oferă o viziune cuprinzătoare asupra evoluției genetice umane din perspectivă maternă (van Oven, 2015).

Secvența genomului mitocondrial uman, secvența de referință Cambridge (CRS), a fost generată în 1981 și a fost utilizată ca secvență de referință pentru a înregistra polimorfismul genetic mitocondrial uman (Anderson și colab., 1981). Opt ani mai târziu, aceasta a fost înlocuită cu o versiune actualizată (Secvența de referință Cambridge revizuită, rCRS) în care erorile inițiale de secvențializare au fost eliminate (Andrews și colab., 1999). Se cunoaște acum că

secvența de referință revizuită aparține haplogroupului european H2a2a1 (van Oven și Kayser, 2009).

### **3.3. Metode de analiza a ADN-ului mitocondrial**

#### **3.3.1. Amplificarea și secvențializarea Sanger a regiunilor hipervariabile**

Metoda tradițională se bazează pe selectarea țintită a regiunilor de interes și amplificarea acestora prin PCR. Fragmentele genetice de interes sunt, de obicei, amplificate din ADN-ul izolat, ținând câteva fragmente nucleotidice scurte și suprapuse (<200 bp), necesare datorită naturii degradate a moleculelor de ADN (Gabriel și colab., 2001). Cea mai frecventă regiune vizată este bucla D (HVS-I) a genomului mitocondrial uman, deoarece este cea mai polimorfică și conține informații filogenetice relevante. Metoda principală folosită pentru secvențializare este metoda Sanger, utilizată pe scară largă și cunoscută acum ca tehnologia de secvențializare de primă generație.

#### **3.3.2. Secvențializarea de nouă generație a întregului genom mitocondrial**

Deși strategiile bazate pe tehnica PCR sunt în prezent cele mai eficiente pentru țintirea și amplificarea regiunilor de ADN de interes, tehnica NGS devine tot mai accesibilă, fiind adesea preferată din mai multe motive (Vai și colab., 2016). Secvențializarea de tip Sanger are o capacitate redusă și, drept consecință, este costisitoare pentru secvențializarea regiunilor genomice vaste, în timp ce platformele NGS permit generarea a miliarde de fragmente genetice într-o singură etapă de secvențializare și, prin urmare, costul este redus substanțial (Rizzi și colab., 2012). Etapele necesare pentru pregătirea probelor pentru secvențializarea NGS necesită mai puțin timp. Un alt avantaj al NGS este posibilitatea de a recupera informațiile genetice stocate chiar și în molecule de ADN scurte (30 pb) care sunt dominante în probele vechi degradate și care nu pot fi detectate prin PCR (Dabney și colab., 2013a). În plus, cu ajutorul instrumenetelor bioinformatică adecvate, se pot evalua tiparele de degradare ale ADN-ului, specifice moleculelor antice, pentru a discerne între secvențele autentice și cele contaminate (Vai și colab., 2016). Aceste aspecte au condus la o creștere substanțială a datelor genetice care au creat necesitatea dezvoltării de noi algoritmi și resurse computaționale pentru a procesa, stoca și a transmite secvențele generate (Muir și colab., 2016).

În prezent, există patru platforme frecvent utilizate pentru secvențierea masivă paralelă, bazate pe principii mai mult sau mai puțin asemănătoare în ceea ce privește construirea bibliotecilor de ADN, chimia reacției de secvențializare și randament (Knapp și Hofreiter, 2010). Cel mai folosit sistem în studiile de ADN este Solexa, comercializat de Illumina, datorită faptului că permite citirea unor fragmente de lungime redusă (75 sau 100 pb), precum cele vechi (Metzker, 2010). Există trei etape cheie pentru generarea citirilor de secvențe: (i) construirea

bibliotecilor de ADN; (ii) capturarea și amplificarea fragmentelor de interes; (iii) secvențializarea NGS.

#### **4. Istoria Europei reflectată de studii de ADN vechi**

##### **4.1. Conexiuni genetice în Epoca Bronzului**

Epoca Bronzului în Europa (3,000-1,000 BC) a fost o perioadă dinamică, caracterizată de mișcări pe scară-largă, înlocuiri și amestecuri populaționale care au modelat peisajul genetic al populației umane moderne din Europa și Asia.

Sudii complexe bazate pe analiza datelor genomice ale indivizilor asociați culturii Yamnaya din regiunea Potico-Caspică au arătat migrarea masivă înspre Europa, în Epoca Bronzului timpuriu. Datele genetice au ilustrat faptul că populația din stepă este un amestec de cel puțin două elemente: descendenți ai vânătorilor-culegătorilor din estul Europei și vânători-culegători din Caucaz (de Barros Damgaard și colab., 2018). Migrația populațiilor din stepa Potico-Caspică, populații de păstori migratori asociați culturii Yamnaya, înspre centrul și nordul Europei și amestecul cu populația locală Neolitică au dat naștere culturii "*Corded-Ware*". În același timp, afinitățile genetice dintre Yamnaya și cultura Afanasievo din regiunea Altai-Sayan, indică un val de migrație estic, înspre centrul Asiei (Allentoft și colab., 2015). Este foarte probabil ca aceste valuri de migrație să fi fost declanșate de inovații tehnologice asociate călăritului, asociate culturii Yamnaya (Nielsen și colab., 2017).

Studiul complex privind primii agricultori din sud-estul Europei (Mathieson și colab., 2018) a arătat că această regiune geografică "a servit ca zonă de contact genetic între est și vest în decursul a mii de ani", cu legături genetice sporadice cu populațiile din stepă, care au avut loc cu până la 2000 de ani mai devreme decât influxul semnelor genetice din stepă în Europa Centrală și de Nord. Chiar dacă istoria genetică a fost caracterizată pentru diferite regiuni geografice din Europa, mai ales din perioada Mezolitică până în Epoca Bronzului, tiparul acestor legături genetice rămâne să fie verificat prin dovezi particulare, specifice fiecărei situații.

##### **4.2. Genetica populațiilor din perioada medievală**

În comparație cu alte perioade istorice, pentru populațiile europene medievale există puține date arheogenetice disponibile, în special pentru regiunea sud-estică. În prezent, peisajul genetic al acestei epoci este ilustrat ca un puzzle cu piese cunoscute mici și dispersate. Până de curând, majoritatea studiilor ADN din perioada medievală au vizat numai regiunea de control a genomului mitocondrial, plus unele SNPs-uri informative din regiunea de codificare, pentru un număr mic de probe (aproximativ 10-30) per populația analizată: protobulgari (Nesheva și colab., 2015); cumani (Bogacsi-Szabo și colab., 2005); lombarzi (Alt și colab., 2014; Vai și

colab., 2015); slavi (Csakyova și colab., 2016; Juras și colab., 2014), vikingi (Krzewinska și colab., 2015); spanioli (Alzualde și colab., 2006). Analize mai aprofundate de genetica populațiilor medievale au fost efectuate pe baza probelor arheologice umane de pe teritoriul actual al Ungariei (Csosz și colab., 2016; Neparaczki și colab., 2017; Tomory și colab., 2007). Cel mai amplu studiu de ADN vechi pentru această regiune și pentru perioada istorică este cel publicat de Neparaczki și colab. (2018). Prin secvențializarea și analizarea a aproximativ 100 de genomuri mitocondriale complete aparținând „ungurilor cuceritori”, autorii arată că indivizii care au cucerit teritoriul Ungariei sunt cel mai probabil urmași ai nomazilor din stepa Potico-Caspică, dar care nu au avut o contribuție majoră asupra fondului genetic din Bazinul Carpatic (Neparaczki și colab., 2018). Studii interdisciplinare asupra invaziilor barbarilor au oferit perspective noi privind organizarea socială și tiparele de migrație asociate longobarzilor, barbari ce își au originea în Pannonia și care au invadat Italia în secolul al VI-lea d.Hr. (Amorim și colab., 2018; Vai și colab., 2018). Chiar dacă cercetarea în domeniul ADN-ului vechi a contribuit la identificarea unor piese de puzzle pe harta arheogenetică medievală a Europei, încă mai există numeroase necunoscute.

#### **4.3. Genomuri moderne și antice din teritoriul actual al României**

Studiile de ADN vechi care utilizează material arheologic provenit de pe actualul teritoriu al României sunt puține, fiind limitate la anumite perioade istorice, cum ar fi Neoliticul timpuriu sau Epoca Bronzului târzie (Hervella și colab., 2015). Probabil cea mai remarcabilă descoperire este reprezentată de o fosilă umană, veche de aproximativ 37.000-42.000 de ani, de la Peștera cu Oase (Trinkaus și colab., 2003). Analiza genetică a acestui specimen a furnizat informații valoroase privind relația dintre omului modern și omul de Neandertal. A fost descoperit că aproximativ 6-9% din genomul individului din Peștera cu Oase derivă din cel al omului de Neandertal, mai mult decât orice altă secvență provenită de la orice om anatomic modern analizat până acum (Fu și colab., 2015). Întregul genom mitocondrial al unui *Homo sapiens* de la Peștera Muierii, vechi de 35.000 de ani, a fost încadrat în haplogrupul bazal U6\*, nemaîntâlnit în genomurile antice sau moderne analizate, ceea ce susține ipoteza unei migrații înapoi spre Africa din Eurasia la începutul Paleoliticului superior (Hervella și colab., 2016). Datele genomice ale altor 12 probe din România, ce datează din perioada Mezolitică până în cea Neolitică, au devenit recent disponibile într-un studiu care vizează clarificarea istoriei genetice a Europei de sud-est (Mathieson și colab., 2018). Patru alte genomuri complete ale unor probele preistorice din Porțile de Fier au fost reconstruite, iar analiza lor a arătat că procesul de neolitizare din bazinul Dunării de Jos sa bazat atât pe mișcări populaționale, cât și pe transferul ideilor (Gonzalez-Fortes și colab., 2017).

În prezent, majoritatea informațiilor despre peisajul genetic al populațiilor românești sunt deduse din diversitatea ADN a locuitorilor actuali, reflectată de analiza regiunii de control a genomului mitocondrial. Câteva studii au încercat să evalueze relația lor genetică cu alte populații moderne din Eurasia (Hervella și colab., 2014; Richards și colab., 2000; Turchi și colab., 2016), în timp ce altele s-au axat pe variația ADNmt în grupurile etnice minoritare (Bosch și colab., 2006; Brandstatter și colab., 2007; Mendizabal și colab., 2012). Prin analiza polimorfismului genetic la nivelul regiunii de control a genomului mitocondrial în rândul a aproximativ 400 de români, s-a constatat că diversitatea genetică este relativ omogenă din punct de vedere geografic în întreaga țară, fondul genetic fiind compus, în principal, din haplogrupuri tipice pentru vestul Eurasiei (Turchi și colab., 2016). Un alt studiu (Hervella și colab., 2014) a arătat că există un anumit grad de diferențiere genetică între indivizii care trăiesc în bazinul Carpatic (România de Nord) și cei din afara Carpaților (România de Sud. Pentru a aduce noi indicii asupra posibilelor rute de migrație din trecut, un alt studiu a arătat că tiparul de distribuție contemporană a haplogrupurilor mitocondriale din provinciile istorice (Țara Românească, Moldova și Dobrogea) este în mare parte guvernat de afinități genetice față de Balcani, în timp ce populația transilvăneană este mai strânsă legată de grupurile din Europa Centrală (Cocos și colab., 2017).

## **II. Scopul studiului**

Primul scop al acestui studiu a fost de a furniza dovezi genetice pentru populațiile istorice locale din sud-estul României (Dobruja), o regiune geografică care a servit de-a lungul timpului ca un pasaj de trecere în ruta populațiilor migratoare, la intersecția dintre Est și Vest. Din acest motiv, au fost analizați genetic indivizi istorici ce provin din două situri arheologice din Dobrogea: necropola medievală asociată cetății Capidava și tumulul de la Mireasa ce datează din Epoca Bronzului.

Pentru fiecare dintre aceste grupuri de indivizi, obiectivul principal a fost acela de a determina arhitectura genetică a liniilor materne care poate reflecta diversitatea genetică, relațiile de înrudire dintre indivizi, structura familiei și a populației, toate indiciile pentru imaginea genetică locală. Al doilea obiectiv a fost extinderea acestei imagini, prin compararea diversității mitocondriale a populațiilor analizate cu alte populații, datate în aceleași perioade istorice. Afinitățile genetice dintre acestea pot oferi clarificări cu privire la mișcările populaționale anterioare și a interacțiunilor dintre ele. Al treilea obiectiv a fost de a realiza o comparație genetică, din perspectivă mitocondrială, între populațiile din aceeași zonă geografică, dar care datează din diferite perioade istorice (Epoca Bronzului, perioada medievală și cea modernă) pentru a identifica modificările genetice în decursul timpului, în sud-estul României. Un alt obiectiv, comun pentru indivizii din ambele situri arheologice, a fost acela de a profita de rezoluția ridicată, furnizată de variația genetică în întregul genom mitocondrial, într-o abordare fitogeografică pentru a identifica posibilele origini genetice ale indivizilor analizați. Având în vedere contextul arheologic particular al necropolei de la Capidava, în care au fost identificate două tipuri de practici de înmormântare (gropi creștine unice și o groapă comună), a fost realizată și evaluarea relațiilor genetice dintre cele două grupuri de indivizi, îngropați în moduri contrastante, în aceeași necropolă.

Al doilea scop al acestui studiu a apărut ca o consecință a cerințelor metodologice, specifice domeniului de cercetare al bioarheologiei moleculare. Protocoalele disponibile pentru analiza acizilor nucleici și a proteinelor din oase și dinți străvechi presupun distrugerii repetate ale probelor, ceea ce duce la pierderea nedorită a materialului arheologic, care este adesea prețios și/sau limitat. Prin urmare, al doilea scop a fost dezvoltarea unei metode de izolare simultană a ADN-ului și a proteinelor din aceeași probă sursă pentru a reduce daunele aduse resturilor arheologice umane și pentru a face uz de informațiile stocate în ambele tipuri de biomolecule.



### III. Materiale și metode

#### 1. Situri arheologice și informații privind probele analizate

Materialul scheletic uman (29 de indivizi), prelucrat și discutat în acest studiu provine din două situri arheologice (Capidava și Mireasa) de pe teritoriul actual al României, regiunea de sud-est (Dobruja).

#### 2. Analize de antropologie fizică

Analizele de antropologie fizică au fost efectuate pentru a aduna informații despre vârsta la momentul morții, sex, leziuni tramactice, condiții patologice și markeri de stres, indicii pentru structura demografică și condițiile epidemiologice în grupul de indivizi istorici analizați. Disponibilitatea dinților bine-conservați a fost un criteriu de selecție *cutoff* pentru analizele de genetică moleculară ulterioare.

##### 2.1. Determinarea profilului biologic

Analiza osteologică a fost efectuată folosind protocoalele standard, descrise anterior (Buikstra și Ubelaker, 1994; Steckel și colab., 2011).

##### 2.2. Evaluarea condițiilor patologice și a leziunilor traumatice

Fiecare schelet a fost analizat cu privire la patologii dentare și scheletice specifice. Principalele patologii dentare evaluate au fost: pierderea *antemortem* a dinților, abcese dentare, tartru și periodontită, carii și hipoplazia dentară a smalțului (DEH) (Buikstra și Ubelaker, 1994; Steckel și colab., 2011). În timpul evaluării inițiale și al diagnosticului diferențial au fost respectate protocoalele descrise în literatura de specialitate (Aufderheide și Rodriguez-Martin, 1998; Ortner, 2003; Roberts și Manchester, 2005; Waldron, 2009). Leziunile traumatice și fracturile au fost determinate urmând metodele descrise de Lovell Nancy (1998) și Buikstra și Ubelaker (1994).

#### 3. Analiza moleculară a ADN-ului vechi

##### 3.1. Metoda clasică pentru reconstruirea regiunilor hipervariabile ale genomului mitocondrial

Regiunea de control, cea mai polimorfică regiune a genomului mitocondrial uman, a fost analizată prin amplificarea fragmentelor de interes cu ajutorul tehnicii PCR.

##### 3.1.1. Pregătirea probelor

Izolarea AN-ului a fost realizată din pulberea obținută cu ajutorul unui micromotor din pulpa dentară, după ce suprafața exterioară a dinților a fost decontaminată.

### 3.1.2. Extracția standard de ADN

Extracția ADN a fost realizată după unul din cele două protocoale folosite în mod obișnuit în laboratorul nostru. Primul protocol (P1), folosit pentru analiza indivizilor medievali de la Capidava, presupune utilizarea coloanelor de centrifugare cu membrană de siliciu și a fost descris de Yang și colab. (1998). Al doilea protocol (P2) a fost folosit pentru analiza probelor de Epoca Bronzului descoperite în tumulul de la Mireasa. Pentru fiecare din aceste probe, ADN-ul a fost izolat folosind un protocol bazat pe utilizarea coloanelor cu membrană de siliciu, care permite recuperarea moleculelor de ADN foarte scurte (Dabney și colab., 2013a).

### 3.1.3. Extracția simultană de ADN-proteine

Această secțiune este parte a articolului: *Rusu I, Paica I, Vulpoi A, Radu C, Mircea C, Dobrinescu C, Bodolică V, Kelemen B (2018) Dual DNA-protein extraction from human archaeological remains. Archaeol Anthropol Sci <https://doi.org/10.1007/s12520-018-0760-1>.*

### 3.1.4. Amplificarea segmentelor hipervariabile (HVS)

Amplificarea celor două segmente hipervariabile (HVS-I și HVS-II) ale genomului mitocondrial uman a fost efectuată folosind un set de patru perechi de amorse speciale pentru amplificarea ADN-ului degradat (Gabriel și colab., 2001). În plus, au fost amplificate câteva SNPs-uri din regiunea codificatoare, semnificative din punct de vedere filogenetic, atunci când încadrarea în haplogrup a fost ambiguă doar pe baza profilului genetic din regiunea HVS.

### 3.1.5. Clonarea și secvențializarea ADN

Prođușii de amplificare au fost clonați, folosind protocolul *Sticky-End* asociat kit-ului CloneJet PCR Cloning (Thermo Scientific, Waltham, USA). Plasmidele recombinante au fost secvențializate la Macrogen Europe (Amsterdam, Olanda) cu amorsa standard pJET1.2R. Toate secvențele rezultate au fost aliniată utilizând algoritmul ClustalW, inclus în BioEdit Sequence Alignment Editor v. 7.2.5.0 (Hall, 1999). Polimorfismul secvențelor rezultate a fost comparat cu secvența de referință Cambridge revizuită (rCRS, NC\_012920) (Andrews și colab., 1999), iar alinierea automată a fost verificată manual. Determinarea haplogrupului a fost efectuată în programul online HaploGrep2 (van Oven, 2015; Weissensteiner și colab., 2016).

### 3.1.6. Criterii de autentificare

Toate etapele experimentale au fost desfășurate conform criteriilor standard pentru analiza moleculară a probelor de proveniență arheologică (Gilbert și colab., 2005; Paabo și colab., 2004; Poinar, 2003) și au fost luate diferite măsuri de precauție pentru prevenirea și identificarea contaminării cu ADN modern. Două subseturi de probe au fost procesate independent de două grupuri de cercetare separate.

### 3.2. Secvențializarea de nouă generație

#### 3.2.1. Extracția ADN și construirea bibliotecilor de ADN

Etapele experimentale efectuate au fost descrise anterior în mod detaliat de către Modi și colab. (2017) și Tassi și colab. (2017). Extracția ADN a fost realizată conform unui protocol care permite recuperarea unor molecule de ADN de până la 50 bp, predominante în probele vechi (Dabney și colab., 2013a). Bibliotecile de ADN dublu-catenar, necesare în vederea secvențializării NGS, au fost construite utilizând protocolul descris de Meyer și Kircher (2010). Acesta cuprinde mai multe etape, printre care: îndreptarea capetelor moleculelor de ADN, ligarea adaptorilor și etichetarea cu secvențe unice fiecărei probe.

#### 3.2.2. Capturarea secvențelor de ADN mitocondrial și secvențializare

Selectarea fragmentelor de interes (genomul mitocondrial uman) din amestecul ADN existent în bibliotecile obținute s-a realizat prin capturare (*target capture*) (Maricic și colab., 2010). Acest proces presupune hibridizarea secvențelor ADN pe bază de complementaritate cu secvențele probă care sunt imobilizate pe sfere magnetice.

#### 3.2.3. Analiza bioinformatică a secvențelor brute

Citirile *paired-end* Illumina au fost prelucrate cu ajutorul programelor bioinformatică descrise de Modi și colab. (2017), iar haplogrupurile mitocondriale pentru fiecare probă au fost determinate cu ajutorul programului HaploGrep (Weissensteiner și colab., 2016), ce utilizează arborele mitocondrial PhyloTree build 17 (van Oven, 2015).

### 4. Analize comparative folosind date de ADNmt din literatură

Datele mitocondriale generate în acest studiu au fost discutate și comparate cu informațiile disponibile în literatura de specialitate pentru a identifica legăturile genetice dintre indivizii analizați și alți indivizi vechi și moderni, care ar putea furniza ulterior indicii privind rutele de migrație ale populațiilor istorice analizate și posibila lor zonă de origine.

#### 4.1. Secvențe moderne și vechi de ADNmt folosite în analizele comparative

Secvențele de ADNmt descărcate din bazele de date de specialitate au fost grupate în patru seturi de date: 495 secvențe medievale HVS-I; 15368 secvențe moderne HVS-I; 387 de genomuri mitocondriale care au haplotipuri identice cu cele observate în grupurile analizate, 282 de genomuri mitocondriale vechi și moderne.

#### 4.1.1. Analize de genetica populațiilor

Analiza componentelor principale (PCA) a fost efectuată pe baza frecvențelor haplogrupurilor mitocondriale, utilizând funcția *prcomp* a pachetului *R-built-in R*, versiunea R

3.3.2 (R Development Core Team, 2016). Gruparea ierarchică aglomerativă a fost realizată pe baza componentelor principale (PCs), folosind metoda Ward (Ward, 1963), iar distanța euclidiană a fost calculată cu ajutorul funcției *pvclust* (Suzuki și Shimodaira, 2015). Semnificația fiecărui cluster este dată ca o valoare AU, exprimată ca procent, ce a fost calculată prin reeșantionarea cu *bootstrap* cu 10.000 de replici.

Indicele de fixare ( $F_{ST}$ ), măsură a diferențelor populaționale, a fost calculat pe baza haplotipurilor cu lungime secvenței uniformă în Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier și Lischer, 2010). Cel mai potrivit model de substituție nucleotidică și estimarea parametrului gama au fost determinate cu jModeltest 2.1.10 (Darriba și colab., 2012; Guindon și Gascuel, 2003). Valorile  $F_{ST}$  au fost calculate pe baza modelului de substituție Tamura & Nei (Tamura și Nei, 1993), 10000 permutări și o valoare de 0,05 atribuită datelor lipsă.

Analiza haplotipului comun (SHA) a fost efectuată prin numărarea haplotipurilor comune și absolute. Rezultatele fiecărui tip de analiză au fost vizualizate într-un spațiu bidimensional, utilizând pachetele specifice din R 3.3.2 (R Development Core Team, 2016).

#### **4.1.2. Analiza filogenetică și filogeografică**

Rețelele *Median-Joining* au fost construite în PopART (Leigh și Bryant, 2015), cu setările implicite. Relațiile filogeografice au fost deduse pe baza originii geografice a celor mai apropiate secvențe similare din literatură.

## **IV. Rezultate și discuții**

### **1. Ereditate maternă în populația medievală de la Capidava**

În provincia istorică Dobruja (sud-estul Europei) se găsesc indicii care marchează trecerea mai multor populații istorice (de exemplu, greci, romani, bizantini, pechenegi, tătari etc.) (Barnea și Ștefănescu, 1971). Un martor al schimbărilor regionale este cetatea Capidava, de la începutul secolului al II-lea d.Hr., când romanii s-au stabilit și au devenit conștienți de importanța sa strategică, până în secolul al XI-lea, când invazia pecenegilor a pus capăt locuirii bizantine în acest loc (Florescu, 1946). Din această perspectivă, Capidava poate fi considerată o poarta de acces pentru populațiile migratoare către Europa de Vest, cu o istorie extrem de complexă în Evul Mediu. În secolul al X-lea d.Hr., când Capidava este alternativ dominată, în contextul conflictelor continue dintre Imperiul Bizantin, Rusii Kievani și Proto-bulgari, de către fiecare dintre ei. Întrebările legate de impactul și amploarea acestor evenimente demografice și politice asociate, care au lăsat amprente asupra structurii genetice locale și au influențat fondul genetic actual european, rămân fără răspuns, chiar dacă primele indicii pot fi deduse din contextul arheologic (Pinter și colab., 2011).

#### **1.1. Contextul arheologic**

Două grupuri de indivizi, descoperiți în același sit arheologic (Capidava, *extramuros*), dar care provin din contexte arheologice diferite au fost analizați genetic în acest studiu: 11 indivizi, înmormântați conform ritualului creștin, din terasa B și 6 indivizi, găsiți într-o groapă comună din zona centrului de informare.

În cazul mormintelor descoperite în terasa B a fost identificat același tipar de înmormântare, și anume: groapă simplă, fără sicriu și o poziție similiară a scheletelor. Acestea erau întinse pe spate, orientate est-vest, cu mâinile pe bazin sau pe piept, ceea ce indică un ritual specific unei populații creștine din sec. X-XI d.Hr (Pinter și colab., 2011). Spre aceeași datăre duce și analiza materialului funerar, prin analogie cu piese de același tip identificate în diverse complexe arheologice din România și sud-estul Europei (Pinter și colab., 2011) .

Spre deosebire de tiparul de înmormântare observat în cazul indivizilor din terasa B, lipsa de considerație pentru cei decedați este evidentă în cazul indivizilor din complexul arheologic C58. Scheletele au fost găsite la baza unei gropi eliptice comune, fără inventar funerar. În cazul acestora nu s-a observat nici un tipar de organizare, fapt ce sugerează că probabil au fost aruncați, fie din neglijență, fie din grabă. Poziția dezorganizată a celor 10 schelete din această groapă și absența ritualurilor religioase specifice perioadei medievale sugerează că acești indivizi nu aparțineau grupului (geografic, social sau religios), erau nedorți sau lipsiți de drepturi în comunitatea locală.

## 1.2. Profilul biologic, patologice, traume

Materialul osteologic provenit din complexul arheologic C58 poate fi atribuit unui număr minim de șase adulți și 3 subadulți. Distribuția pe sexe este puțin dezechilibrată, deoarece patru dintre indivizi au trăsături morfologice masculine (Cap-C58-1, Cap-C58-2, Cap-C58-3 și Cap-C58-5), iar ceilalți doi au markeri scheletici care indică faptul că sunt probabil femei (Cap-C58-6 și Cap-C58-11). Condițiile patologice identificate (hipoplazia dentară, *cribra orbitalia*, hiperostoza poroasă, patologii dentare, inflamația periostică și leziunile osteolitice pe vertebre) reflectă calitatea slabă a vieții acestui grup de indivizi. Incidența indicatorilor de stres este mai ridicată în cazul indivizilor din groapa comuna, în comparație cu cei din “necropola creștină”. Indivizii de sex masculin din C58 au leziuni traumatice. Tiparul acestor traume indică o moarte violentă pentru aproape jumătate dintre indivizii din mormântul comun, toți bărbați, care ar putea fi rezultatul unei lupte.

Rămășițele osteologice descoperite în terasa B pot fi atribuite unui număr de 15 indivizi. Dintre cei 11 incluși în analiza moleculară, șase sunt fost subadulți, 3 sunt fost femei, iar ceilalți doi sunt bărbați. Categoria de vârstă din acest grup variază de la 38-40 săptămâni prenatale (Cap-M6) până la 39,2-56 ani (Cap-M3). Spre deosebire de grupul C58 (unde toți bărbații au prezentat leziuni traumatice), acești indivizi nu prezintă semne de moarte violentă.

## 1.3. Diversitatea genetică în rândul indivizilor înmormântați după ritual creștin, reflectată de regiunea de control a genomului mitocondrial

Această secțiune este parte a articolului: *Rusu I, Modi A, Vai S, Pilli E, Mircea C, Radu C, Urduzia C, Pinter ZK, Bodolica V, Dobrinescu C, Hervella M, Popescu O, Lari M, Caramelli D, Kelemen B (2018) Maternal DNA lineages at the gate of Europe in the 10th century AD. PLOS One 13:e0193578.*

### 1.3.1. Autentificarea rezultatelor

Regiunea mitocondrială de control a celor zece indivizi creștini medievali a fost reconstruită cu succes, folosind o varietate de tehnici în trei laboratoare diferite. Toate secvențele care au fost replicate, împreună cu rezultatele controalelor negative și prezența greșelilor datorate degradării *post-mortem* în toate clonele sugerează că secvențele generate sunt autentice. Rezultatele inconsecvente între laboratoare au fost obținute doar pentru individul Cap-M5 și, prin urmare, acesta a fost exclus din analizele ulterioare. Rezultatele obținute prin două metode de extracție diferite (extracție standard și extracție simultană ADN-proteine) au fost echivalente pentru probele medievale sau mai recente, fapt ce sugerează că protocolul de co-extracție a biomoleculilor poate fi folosit pentru a obține informații genetice autentice.

### **1.3.2. Haplogrupuri mitocondriale și relațiile dintre indivizi**

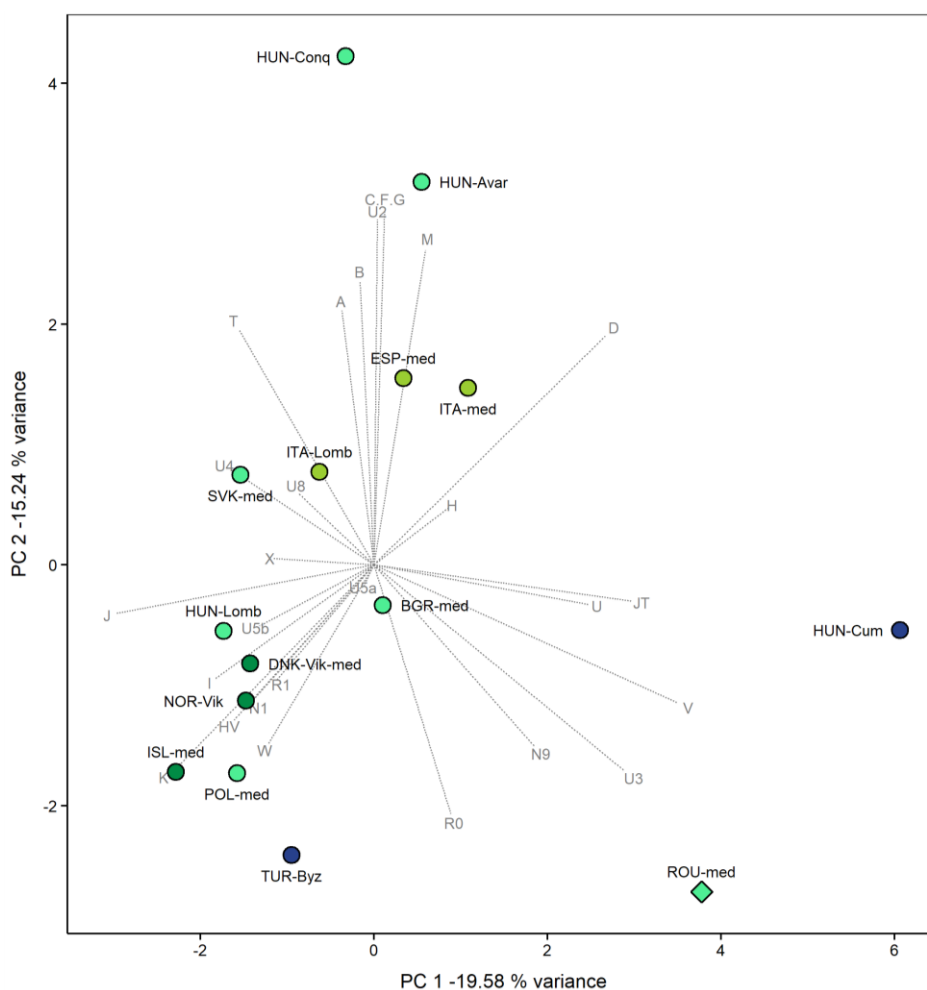
Cele 10 secvențe consens obținute pentru indivizii creștini, ce cuprind intervalele nucleotidice 37-357 și 16009-16390 pot fi clasificate în 8 haplotipuri. Haplotipuri identice au fost identificate în două grupuri de câte doi indivizi ce provin din morminte adiacente (Cap-M3 și Cap-M4 aparțin hg R0a2'3; Cap-M9 și Cap-M11 încadrate în hg N9a). Numărul mare de relații materne strânse în cadrul acestui grup, în raport cu mărimea populației, sugerează că legăturile familiale erau un factor important pentru distribuția spațială a înmormântării. Pentru a evita suprareprezentarea liniilor de ADNmt, din cauza relațiilor familiale, secvențele duplicate au fost eliminate din analiza statistică ulterioară. Grupul de indivizi medievali creștini analizați conține, predominant, linii materne vest eurasiatice (H, R0, U3, U5 și V), componenta est eurasiatică fiind reprezentată de hg N9a cu o frecvență de 12,5%.

### **1.3.3. Conexiuni genetice cu alte populații medievale**

Analiza PCA a celor 15 populații medievale reflectă o grupare laxă între populația analizată (ROU-med) și cumani de-a lungul componentelor PC1 și PC2 (Fig. 1). Aceste două populații sunt plasate destul de departe față de restul populațiilor medievale europene, aflându-se la polul opus de-a lungul axei PC2 față de avari și cuceritorii maghiari, deși geografic sunt apropiate. Legături genetice strânse pot fi observate între populațiile ce aparțin aceleași zone geografice, însă acest tipar se observă numai pentru populațiile medievale din Europa de Sud și cele din Europa de Nord. Astfel de conexiuni au fost observate anterior de Csakyova și colab. (2016).

Clusteringul ierarhic ilustrează o distribuție a populațiilor similară cu cea reflectată de analiza PCA, dar accentuează legătura strânsă dintre populația medievală de la Capidava (indivizii din terasa B) și cumani, fapt ce poate fi explicat prin interacțiunea tuturor PC-urilor în această analiză.

În comparație cu alte populații care datează din aceeași perioadă istorică, populația analizată nu prezintă diferențe statistice semnificative față de celelalte ( $p > 0,05$ ). Cele mai mici valori  $p$  asociate cu cele mai mari valori  $F_{ST}$ , au fost observate în populația medievală din Slovacia (SVK-med) cu  $p = 0,08336 \pm 0,0028$  și  $F_{ST} = 0,05047$  și în cea din Italia (ITA-med) cu  $p = 0,12999 \pm 0,0036$  și  $F_{ST} = 0,04055$ . Cele mai mici distanțe genetice inter-populaționale au fost observate față de bulgarii medievali ( $F_{ST} = -0.02839$ ), Vikingi ( $F_{ST} = -0.02839$ ), Avari ( $F_{ST} = -0.0207$ ) și Cumani ( $F_{ST} = -0.0207$ ).



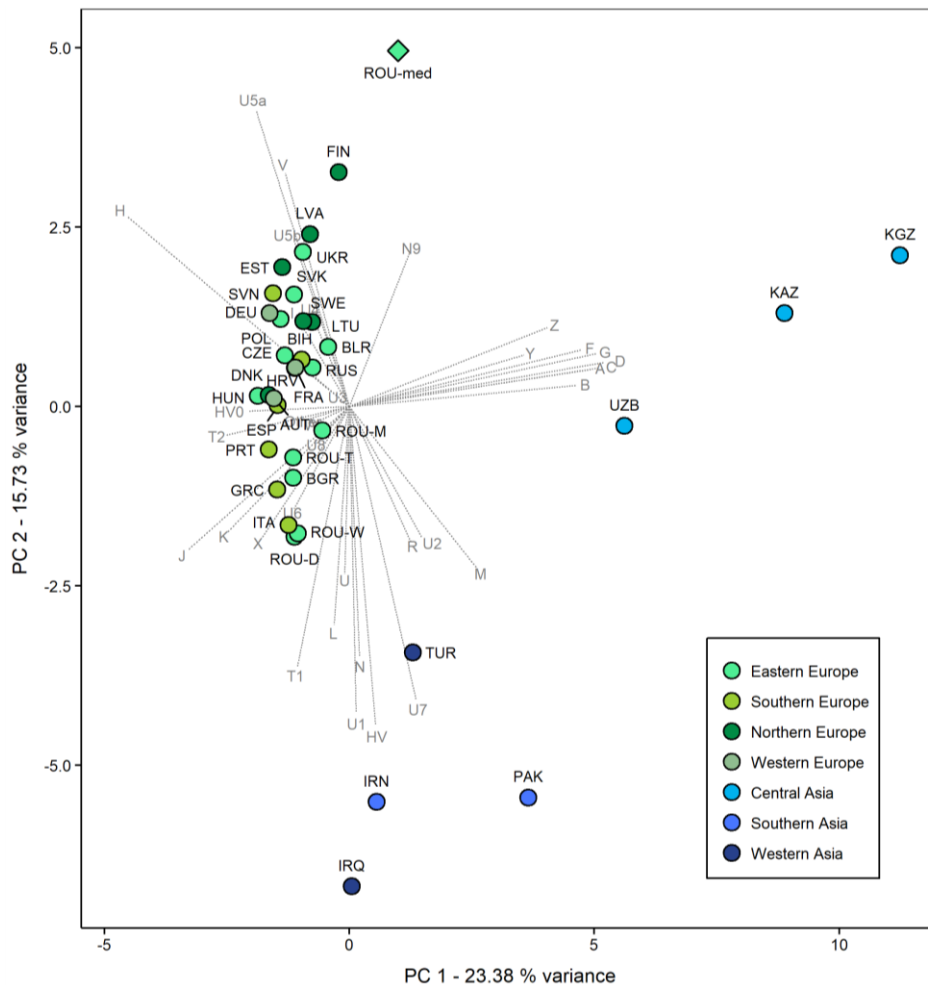
**Fig. 1.** Analiza PCA pe baza frecvențelor haplogrupurilor identificate în 15 populații medievale. ROU-med include 8 indivizi din necropola creștină de la Capidava.

Analiza haplotipurilor comune (SHA) între populațiile medievale reflectă un rezultat diferit față de cel obținut pe baza distanțelor genetice. În acest caz, populația analizată are în comun cele mai multe haplotipuri cu populațiile medievale din Spania și Italia. Procentul mare de linii materne comune între aceste populații se datorează, cel mai probabil, frecvenței ridicate a haplogrupului H, cel mai comun în populația modernă est eurasiană, fapt ceea îl face puțin informativ în acest context (populație cu număr mic de indivizi, rezoluția scăzută a HVS-I).

#### 1.3.4. Legături genetice cu populații moderne

Diagrama PCA a populațiilor eurasiatice contemporane și a populației medievale de la Capidava arată aglomerarea celor europene moderne, spre deosebire de populațiile asiatice moderne care sunt dispersate (Fig. 2). De-a lungul PC1, populația analizată este mai îndepărtată de grupurile europene moderne decât cele din Asia, dar contribuția PC2 arată că aceste legături nu sunt chiar atât de strânse. Din populațiile europene, cele care par să aibă o afinitate genetică mai mare față de cea analizată sunt în principal populațiile slavice din Europa de Est, precum și cele care își au originea în Europa de Nord.





**Fig. 2.** Analiza PCA a populațiilor moderne și a celei investigate în acest. ROU-med include 8 indivizi din necropola creștină de la Capidava.

Diagrama MDS (*Multidimensional scaling*) ilustrează un tipar similar celui reflectat de graficul PCA, arătând legătura strânsă între majoritatea populațiilor europene moderne de-a lungul celor două coordonate, în timp ce populațiile asiatice sunt mai răsfricate. Din populațiile asiatice vestice, cea din Turcia prezintă afinități mai puternice față de cele europene și, de asemenea, față de populația medievală analizată. Acest fapt poate fi explicat prin multiple interacțiuni în decursul istoriei dintre popoarele din aceste regiuni.

#### 1.4. Profilul genetic reflectat de secvența întregului genom mitocondrial

Întregul genom mitocondrial a fost reconstruit pentru 11 indivizi medievali din necropola de la Capidava, folosind metoda de captură prin hibridizare din soluție combinată cu secvențierea ADN de înaltă performanță.

##### 1.4.1. Rezultatele procesării bioinformatică a datelor brute

Secvențele rezultate au calitatea standard necesară pentru a garanta certitudinea datelor NGS pentru toate probele, mai puțin pentru Cap-M5 care a fost exclusă din analizele ulterioare.

### 1.4.2. Rafinarea încadrării în haplogrup a indivizilor creștini

Pe lângă autentificarea rezultatelor obținute pe baza analizei regiunii de control, informația genetică furnizată de întregul genom al celor cinci indivizi creștini a permis rafinarea încadrării în haplogrup (realizată inițial pe baza motivelor mutaționale de la nivelul regiunilor hipervariabile).

Conform datelor mitogenomice de înaltă rezoluție, individul M2 aparține haplogrupului V1a, sublinie a haplogrupului vest Eurasianic V, dispersată în prezent, conform secvențelor mitocondriale complete, în întreaga Europă și Rusia Europeană. Datele NGS confirmă faptul că M9 și M11 au haplotipuri indentice și, datorită prezenței tranziției T2287C, pot fi clasificate în N9a9. Legătura genetică cu Asia Centrală, deja demonstrată de datele din regiunea de control, este acum și mai evidentă, deoarece atât M9, cât și M11 au în comun cele două mutații private (G228T și A15799G) cu doi indivizi moderni, unul aparținând grupului etnic *Tubalar* și unul care aparține grupului etnic *Kyrgyz*. Haplotipurile comune H, identificate pe baza regiunii de control, pentru probele M15 și M17 pot fi, de asemenea, rafinate. Proba M15 conține toate mutațiile definitorii pentru H13a1a3, în timp ce variabilitatea maternă observată în secvența completă a probei M17 poate fi clasificată ca H5e1a1, având o mutație privată (A13731G). Clasificarea mai profundă în V1a, H13a1a3 și H5e1a1 pentru cei trei indivizi atrage atenția asupra legăturilor mult mai limitate din punct de vedere geografic către Europa Centrală și de Est, reducând astfel și mai mult puterea conexiunii aparente cu populația medievală italiană, spaniolă și alte populații peri-mediteraneene, care a rezultat din analiza frecvențelor generice ale haplogrupului H (SHA).

### 1.4.3. Diversitatea haplogrupurilor mitocondriale în rândul indivizilor din groapa comună (complex C58)

Această secțiune este parte a articolului: *Rusu I, Modi A, Radu C, Mircea C, Vulpoi A, Dobrinescu C, Bodolică V, Potârniche T, Popescu O, Caramelli D, Kelemen B (2019) Mitochondrial ancestry of medieval individuals carelessly interred in a multiple burial from southeastern Romania. Sci Rep, 9, 961, doi:10.1038/s41598-018-37760-8.*

### 1.4.4. Distribuția geografică și relațiile filogenetice pentru liniile materne identificate în rândul indivizilor din groapa comună

Rezoluția mai crescută a secvențelor mitocondriale complete a permis identificarea legăturilor directe dintre mitogenomurile vechi și moderne apropiate și clarificarea afinităților geografice. Analiza filogenetică a arătat că trei haplogrupuri (H11a1, U4d2 și J1c15) sunt comune în Eurasia (Fig. 3), în timp ce T2b este răspândit pe întreg teritoriul Europei. Relațiile

genetice elucidate pe baza rețelelor *median-joining* indică afinități geografice restrânse la Orientul Mijlociu în cazul N1a3a și la regiunea mediteraneană pentru U6a1a1.

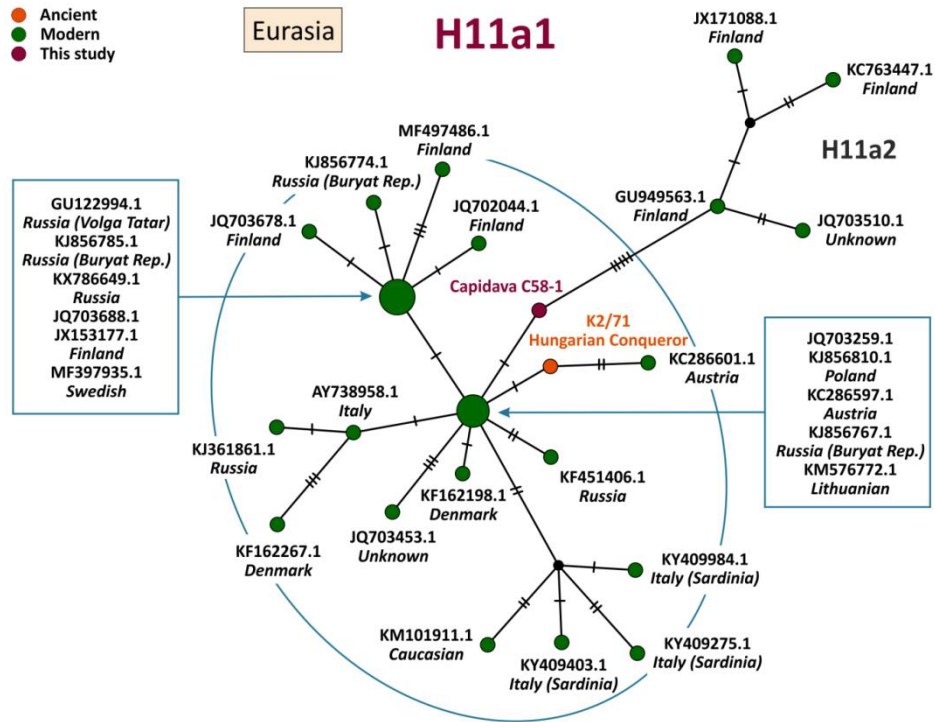
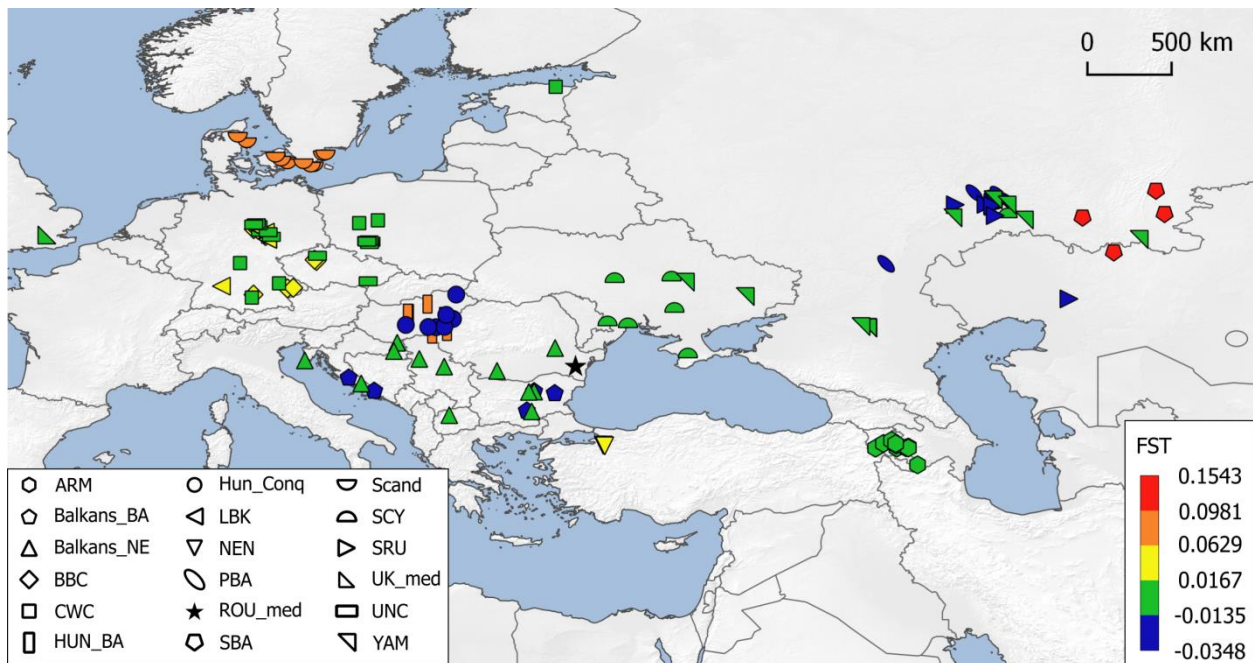


Fig. 3. Rețeaua filogenetică de haplotipuri H11a1.

#### 1.4.5. Relații genetice ale populației medievale de la Capidava cu alte populații vechi

Rezultatele  $F_{ST}$  indică faptul că populația medievală din sud-estul Europei (toate mitogenomurile de la Capidava) prezintă cele mai mici distanțe genetice față de alte patru populații istorice: o populație de Epoca Bronzului din Peninsula Balcanică (Balkans\_BA) ( $F_{ST} = -0.0348$ ), *Srubnaya* (SRU) ( $F_{ST} = -0.02367$ ), *Poltavka-Potapovka* (PBA) ( $F_{ST} = -0.01677$ ), și *Hungarian Conquerors* (HUN\_Conq) ( $F_{ST} = -0.01325$ ); aceste valori fiind ne semnificative ( $p > 0.05$ ). Cinci dintre grupurile antice (SBA, Scand, NEN, HUN\_BA, and BBC) cu care a fost efectuată comparația par să fie cele mai îndepărtate din punct de vedere genetic de populația analizată, gradul de diferențiere fiind semnificativ (Fig. 4).



**Fig. 4.**  $F_{ST}$  și distribuția geografică. Cele mai mici valori ale  $F_{ST}$  care indică cele mai mici distanțe genetice sunt marcate cu albastru. ROU-med include 11 genomuri mitocondriale complete de la Capidava. Harta a fost creată folosind QGIS 2.18.11 (QGIS Development Team, 2016.).

Diagrama MDS reflectă legătura extrem de strânsă dintre populația ROU-med și populații de Epoca Bronzului cu originea în stepa Pontico-Caspică (cultura *Srubnaya* și strămoșii săi, *Potapovka* și *Poltavka*). Grupul analizat are afinități genetice strânse cu populația de Epoca Bronzului din Balcani, precum și cu *Hungarian Conquerors*, grupuri apropiate din punct de vedere geografic. Cele mai diferite populații sunt *Near Eastern Neolithic*, *Sintashta-Andronovo*, și *Bell Beaker*. Prin urmare, compoziția genetică maternă a populației Capidava indică o origine mixtă din mai multe surse.

### 1.5. Influențe genetice și posibilele origini geografice ale indivizilor studiați

Diversitatea genetică ridicată în rândul indivizilor medieval de la Capidava, înmormântați conform ritualului creștin, sugerează existența unui mediu dinamic. Duplicatale genetice asociate indivizilor descoperiți în morminte alăturate evidențiază posibile afiliere familiale pe linie maternă, caracteristice pentru cimitirele creștine. Prezența haplogrupului N9a cu originea în centru Asiei la doi indivizi pare să plaseze Capidava într-un peisaj genetic dominat de influențe turcice, în timp ce liniile comune europene (H și V) indică conexiuni genetice cu Europa Centrală și de Est.

Compoziția genetică a celor 6 indivizi, descoperiți în groapa comună C58 (șase indivizi, șase haplogrupuri) reflectă lipsa unor relații materne strânse și o istorie complexă, deoarece haplotipurile identificate au o distribuție geografică variată (Eurasia, Orientul Mijlociu, Europa

de Sud). Toate informațiile furnizate de genomul mitocondrial complet furnizează dovezi suplimentare pentru legături genetice strânse ale populației de la Capidava cu populația medievală de pe teritoriul actual al Ungariei și populații de Epoca Bronzului cu originea în stepa Potico-Caspică.

## **2. Linii mitocondriale la indivizii de Epoca Bronzului și premoderni din situl arheologic**

### **Mireasa**

În anul 2012 au fost descoperite în apropierea satului Mireasa, situat în regiunea Dobrogea, două contexte arheologice asociate unui tumul (o necropola premodernă mare și un mic ansamblu de morminte de Epoca Bronzului). Probe arheologice datate în ambele perioade istorice au fost analizate molecular, pentru a evidenția schimbările genetice care au avut loc în această regiune.

### **2.1. Contextul arheologic și datarea cu radiocarbon**

Tumulul T38 a inclus 15 morminte din Epoca Bronzului, care, pe baza contextului funerar (intrarea care duce la o cameră funerară, grinzi de lemn, poziția ghemuită a scheletelor, pulberea de ocră) ar putea fi asociate cu cultura Yamnaya. Inventarul funerar sărac pare a fi o trăsătură regională pentru cultura Yamnaya (care contribuie la distincția dintre Yamnaya de la vestul Mării Negre și rudele sale nord-pontice). Considerând arhitectura funerară, poziția și orientarea scheletelor și analogiile cu alte gropi de inhumare descoperite în Dobrogea, celelalte 147 morminte au părut să aparțină perioadei medievale, dar datarea directă cu radiocarbon a unei probe (Mir-M66) a arătat că acest individ este datat în perioada premodernă.

### **2.2. Analiza osteologică**

Examinarea morfologică a rămășițelor umane a 12 indivizi de Epoca Bronzului din Mireasa arată că șase dintre ei sunt adulți, iar ceilalți șase sub-adulți. Sexul a putut fi determinat pentru cinci indivizi, toți fiind bărbați. Prezența hipoplaziei la nivelul smalțului dentar, cribra orbitalia și a hiperostozei poroase corelate cu afecțiunile dentare și inflamația periostică sugerează că acest grup populațional a prezentat deficiențe nutriționale și/sau un posibil status imunologic scăzut. Cu toate acestea, indivizii au reușit să depășească aceste deficiențe, în toate cazurile leziunile fiind vindecate.

### **2.3. Tipare ale polimorfismelor la nivelul regiunii de control mitocondriale**

Din cei 12 indivizi de Epoca Bronzului din Mireasa, ghidându-ne după starea de conservare a dinților, nouă au fost selectați pentru analiza moleculară. Tiparul polimorfismelor regiunii de control a fost obținut și pentru trei probe pre-moderne de la Mireasa.

### **2.3.1. Cele mai probabile haplogrupuri mitocondriale ale indivizilor de Epoca Bronzului analizați**

Pe baza variației observate la nivelul regiunii de control mitocondriale a grupului de Epoca Bronzului din Mireasa, compoziția haplotipurilor a acestei populații pare să fie limitată la câteva linii maternale eurasiatice comune, în procente egale (H, K, HV și U) și un haplogrup non-H (probabil D, care apare cu frecvențe crescute în Asia de Est).

### **2.3.2. Haplogrupurile mitocondriale ale probelor pre-moderne**

Cele două fragmente ale hipervariabile din regiunea de control a genomului mitocondrial au fost reconstruite cu succes pentru trei indivizi din necropola pre-modernă de la Mireasa. Secvența de consens pentru Mir-M47 conține polimorfismele de diagnostic necesare pentru clasificarea sa în haplogrupul C, un haplogrup bazal din estul Eurasiei, și care apare pentru prima dată în seturile de eșantioane prelucrate în acest studiu. Atribuirea haplogrupului pentru individul Mir-M67 are putere moderată deoarece din secvența regiunii de control lipsesc două SNP-uri de diagnostic pentru haplogrupul K (73G și 16311C). Absența lor pare a fi reală, deoarece mutațiile nu au apărut în niciunul dintre replicate. Individul pre-modern Mir-M69 este încadrat în haplotipul (HV13), derivat din haplogrupul HV, dar diferit de haplotipuri similare identificate în probele de Epoca Bronzului localizate în apropiere. Acest haplotip aparține nu a fost detectat frecvent în populațiile istorice. În prezent, singurul specimen vechi aparținând lui HV13 este un individ Kangju din epoca târzie a fierului din stepa central-asiatică.

## **2.4. Profilul mitocondrial complet al indivizilor de Epoca Bronzului**

Genomurile mitocondriale complete au fost reconstruite pentru doi indivizi de Epoca Bronzului din necropola asociată tumulului T38.

### **2.4.1. Rezultatul analizei bioinformatică**

Secvențele obținute au atins standardul de calitate necesar pentru a garanta validitatea secvențelor NGS pentru ambele probe de Epoca Bronzului.

### **2.4.2. Relații filogenetice și filogeografice**

Genomurile mitocondriale complete reconstruite pentru doi indivizi de Epoca Bronzului de la Mireasa permit atribuirea exactă a haplogrupurilor din care fac parte. Individul Mir-M160 conține toate mutațiile de diagnostic necesare pentru încadrarea în haplotipul U4a, o subcladă eurasiatică a haplogrupului U4. Conține în plus o mutație privată în regiunea de control (poziția 12172). Acest haplotip are o distribuție geografică largă în populația europeană modernă și pare a fi bine reprezentată și în populații de vârste istorice (Fig. 5). Polimorfismele observate în genomul mitocondrial complet al individului Mir-M4 permit clasificarea sa în haplotipul K1c1, o

sub-ramură a haplogrupului K1 (Fig. 6). Deleția de la poziția 498 asociată acestei variante mitocondriale specifice este absentă, deși a fost observată în toate clonele generate în cadrul abordării PCR-clonare-secvențializare. K1c1 este un haplotip comun în populațiile moderne din nord-vestul Europei (Finnila și colab., 2001; Raule și colab., 2014) și în unele țări slave (Behar și colab., 2012; Malyarchuk și colab., 2017).

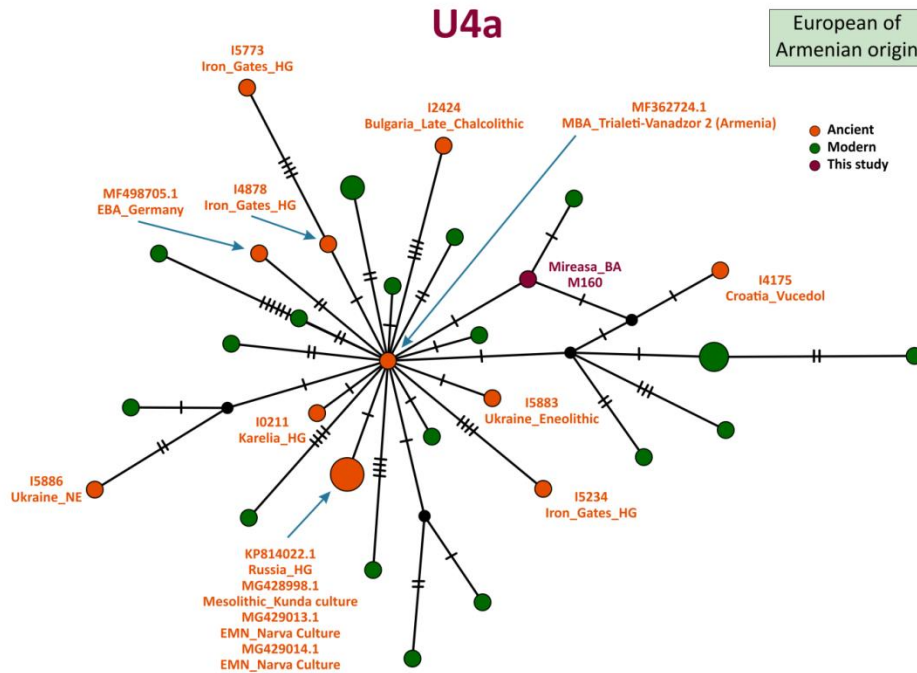


Fig. 5. Rețea filogenetică – haplotipul U4a.

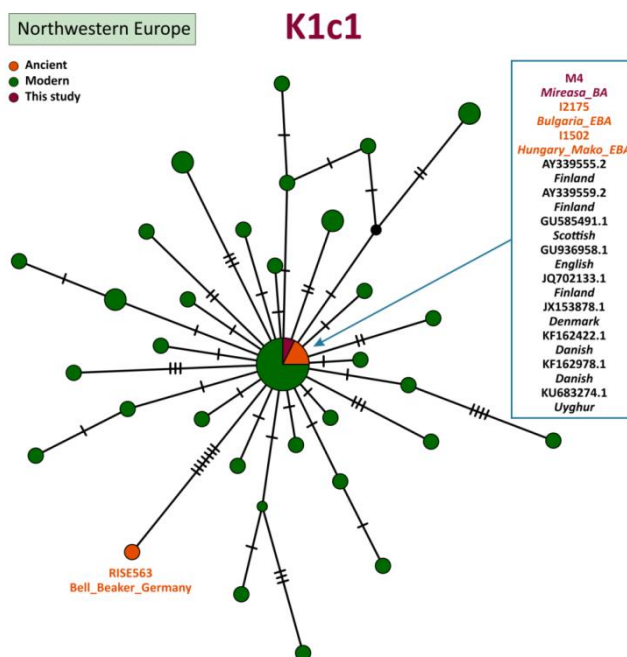


Fig. 6. Rețea filogenetică - haplotipul K1c1.

## **V. Concluzii și perspective**

Această teză oferă noi perspective asupra eredității materne a populațiilor din sud-estul României, o regiune geografică care este slab reprezentată pe harta arheogenetică europeană, dar de mare interes datorită transformărilor sociale, culturale și demografice complexe din trecut. În același timp, a fost dezvoltat un nou protocol, conceput pentru a co-purifica ADN-ul și proteinele din resturile umane arheologice pentru a minimiza distrugerea acestui material biologic valoros.

În prezent, diferite regiuni geografice și perioade istorice sunt caracterizate prin seturi de date dezechilibrate, fie din cauza numărului de probe analizate/regiune, fie din cauza diferențelor de rezoluție a fragmentelor genetice de interes, fapt ce împiedică efectuarea unor analogii puternice, fără echivoc. Importanța principală a acestui studiu constă în furnizarea unei liste de semnături genetice mitocondriale pentru o regiune geografică lipsită de astfel de informații, situație adesea întâlnită pentru multe alte populații istorice europene, în special pentru cele medievale. În epoca tehnologiei NGS, o masă critică de date genetice trebuie atinsă pentru a permite efectuarea unor comparații ulterioare, mult mai informative filogenetic, filogeografic și demografic.

În viitor, considerăm ideală implementarea tehnologiei NGS în laboratorul nostru, în așa fel încât să putem analiza genomuri mitocondriale vechi pentru regiuni cu o dinamică populațională semnificativă (valuri distincte de migrație, evenimente de colonizare anterioare epocii moderne. Deși analiza genomului mitocondrial în populațiile istorice este încă pertinentă aș dori să extind cercetarea proprie spre analiza genomului nuclear pornind de la specimene arheologice. Analiza mai multor loci independenți va fi extrem de utilă în reconstrucția istoriei demografice a populațiilor și a tiparelor de migrație, la o rezoluție mult mai mare



### Bibliografie

- Allentoft ME, Sikora M, Sjogren KG, Rasmussen S, Rasmussen M, Stenderup J et al. 2015, Population genomics of Bronze Age Eurasia. *Nature* 522:167-+.
- Alt KW, Knipper C, Peters D, Muller W, Maurer AF, Kollig I et al. 2014, Lombards on the Move - An Integrative Study of the Migration Period Cemetery at Szolad, Hungary. *PLoS ONE* 9:e110793.
- Alzualde A, Izagirre N, Alonso S, Alonso A, Albarran C, Azkarate A, de la Rúa C. 2006, Insights into the "isolation" of the Basques: mtDNA lineages from the historical site of Aldaieta (6th-7th centuries AD). *Am J Phys Anthropol* 130:394-404.
- Amorim CEG, Vai S, Posth C, Modi A, Koncz I, Hakenbeck S et al. 2018, Understanding 6th-century barbarian social organization and migration through paleogenomics. *Nat Commun* 9.
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, Debruijn MHL, Coulson AR, Drouin J et al. 1981, Sequence and Organization of the Human Mitochondrial Genome. *Nature* 290:457-465.
- Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. 1999, Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet* 23:147-147.
- Aufderheide AC, Rodriguez-Martin C (1998) The Cambridge Encyclopedia of Human Paleopathology vol 478. Cambridge University Press, Cambridge
- Austin JJ, Ross AJ, Smith AB, Fortey RA, Thomas RH. 1997, Problems of Reproducibility-Does Geologically Ancient DNA Survive in Amber-Preserved Insects? *Proc Biol Sci* 264:467-474.
- Barnea I, Ștefănescu Ș (1971) Bizantini, romani și bulgari la Dunărea de Jos vol III. Din istoria Dobrogei. Editura Academiei Republicii Populare Române,
- Behar DM, van Oven M, Rosset S, Metspalu M, Loogvali EL, Silva NM et al. 2012, A "Copernican" reassessment of the human mitochondrial DNA tree from its root. *Am J Hum Genet* 90:675-684.
- Bogacsi-Szabo E, Kalmar T, Csanyi B, Tomory G, Czibula A, Priskin K et al. 2005, Mitochondrial DNA of ancient Cumanians: culturally Asian steppe nomadic immigrants with substantially more western Eurasian mitochondrial DNA lineages. *Hum Biol* 77:639-662.
- Bosch E, Calafell F, Gonzalez-Neira A, Flaiz C, Mateu E, Scheil HG et al. 2006, Paternal and maternal lineages in the Balkans show a homogeneous landscape over linguistic barriers, except for the isolated Aromuns. *Ann Hum Genet* 70:459-487.
- Brandstatter A, Egyed B, Zimmermann B, Duftner N, Padar Z, Parson W. 2007, Migration rates and genetic structure of two Hungarian ethnic groups in Transylvania, Romania. *Ann Hum Genet* 71:791-803.
- Buikstra JE, Ubelaker DH (1994) Standards for data collection from human skeletal remains: proceedings of a seminar at the Field Museum of Natural History vol 44. Arkansas Archeological Survey,
- Campos PF, Craig OE, Turner-Walker G, Peacock E, Willerslev E, Gilbert MT. 2012, DNA in ancient bone - where is it located and how should we extract it? *Ann Anat* 194:7-16.
- Chen YS, Torroni A, Excoffier L, Santachiara-Benerecetti AS, Wallace DC. 1995, Analysis of mtDNA variation in African populations reveals the most ancient of all human continent-specific haplogroups. *Am J Hum Genet* 57:133-149.
- Cocos R, Schipor S, Hervella M, Cianga P, Popescu R, Banescu C et al. 2017, Genetic affinities among the historical provinces of Romania and Central Europe as revealed by an mtDNA analysis. *BMC Genet* 18:20.
- Cooper A, Poinar HN. 2000, Ancient DNA: do it right or not at all. *Science* 289:1139.

- Csakyova V, Szecsenyi-Nagy A, Csoz A, Nagy M, Fusek G, Lango P et al. 2016, Maternal Genetic Composition of a Medieval Population from a Hungarian-Slavic Contact Zone in Central Europe. *PLoS ONE* 11:e0151206.
- Csoz A, Szecsenyi-Nagy A, Csakyova V, Lango P, Bodis V, Kohler K et al. 2016, Maternal Genetic Ancestry and Legacy of 10(th) Century AD Hungarians. *Sci Rep* 6:33446.
- Dabney J, Knapp M, Glocke I, Gansauge MT, Weihmann A, Nickel B et al. 2013a, Complete mitochondrial genome sequence of a Middle Pleistocene cave bear reconstructed from ultrashort DNA fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:15758-15763.
- Dabney J, Meyer M, Paabo S. 2013b, Ancient DNA damage. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5.
- Damgaard PB, Marchi N, Rasmussen S, Peyrot M, Renaud G, Korneliussen T et al. 2018, 137 ancient human genomes from across the Eurasian steppes. *Nature* 557:369-374.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. 2012, jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods* 9:772.
- de Barros Damgaard P, Martiniano R, Kamm J, Moreno-Mayar JV, Kroonen G, Peyrot M et al. 2018, The first horse herders and the impact of early Bronze Age steppe expansions into Asia. *Science* 360.
- Deguilloux MF, Ricaud S, Leahy R, Pemonge MH. 2011, Analysis of ancient human DNA and primer contamination: one step backward one step forward. *Forensic Sci Int* 210:102-109.
- Excoffier L, Lischer HE. 2010, Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour* 10:564-567.
- Finnila S, Lehtonen MS, Majamaa K. 2001, Phylogenetic network for European mtDNA. *Am J Hum Genet* 68:1475-1484.
- Florescu G (1946) Capidava în epoca migrațiilor vol XVI. RIR, vol 4.
- Fu Q, Hajdinjak M, Moldovan OT, Constantin S, Mallick S, Skoglund P et al. 2015, An early modern human from Romania with a recent Neanderthal ancestor. *Nature* 524:216-219.
- Gabriel MN, Huffine EF, Ryan JH, Holland MM, Parsons TJ. 2001, Improved MtDNA sequence analysis of forensic remains using a "mini-primer set" amplification strategy. *J Forensic Sci* 46:247-253.
- Galtier N, Nabholz B, Glemin S, Hurst GD. 2009, Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Mol Ecol* 18:4541-4550.
- Gilbert MT, Bandelt HJ, Hofreiter M, Barnes I. 2005, Assessing ancient DNA studies. *Trends Ecol Evol* 20:541-544.
- Gonzalez-Fortes G, Jones ER, Lightfoot E, Bonsall C, Lazar C, Grandal-d'Anglade A et al. 2017, Paleogenomic Evidence for Multi-generational Mixing between Neolithic Farmers and Mesolithic Hunter-Gatherers in the Lower Danube Basin. *Curr Biol* 27:1801-1810 e1810.
- Guindon S, Gascuel O. 2003, A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 52:696-704.
- Hajdinjak M, Fu Q, Hubner A, Petr M, Mafessoni F, Grote S et al. 2018, Reconstructing the genetic history of late Neanderthals. *Nature* 555:652-656.
- Hall TA. 1999, BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp* 41:95-98.
- Hervella M, Izagirre N, Alonso S, Ioana M, Netea MG, de-la-Rua C. 2014, The Carpathian range represents a weak genetic barrier in South-East Europe. *BMC Genet* 15:56.
- Hervella M, Rotea M, Izagirre N, Constantinescu M, Alonso S, Ioana M et al. 2015, Ancient DNA from South-East Europe Reveals Different Events during Early and Middle Neolithic Influencing the European Genetic Heritage. *PLoS ONE* 10:e0128810.
- Hervella M, Svensson EM, Alberdi A, Gunther T, Izagirre N, Munters AR et al. 2016, The mitogenome of a 35,000-year-old Homo sapiens from Europe supports a Palaeolithic back-migration to Africa. *Sci Rep* 6:25501.
- Higuchi R, Bowman B, Freiburger M, Ryder OA, Wilson AC. 1984, DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature* 312:282-284.

- Hofreiter M, Paijmans JL, Goodchild H, Speller CF, Barlow A, Fortes GG et al. 2015, The future of ancient DNA: Technical advances and conceptual shifts. *Bioessays* 37:284-293.
- Hofreiter M, Serre D, Poinar HN, Kuch M, Paabo S. 2001, Ancient DNA. *Nat Rev Genet* 2:353-359.
- Juras A, Dabert M, Kushniarevich A, Malmstrom H, Raghavan M, Kosicki JZ et al. 2014, Ancient DNA reveals matrilineal continuity in present-day Poland over the last two millennia. *PLoS ONE* 9:e110839.
- Kirsanow K, Burger J. 2012, Ancient human DNA. *Ann Anat* 194:121-132.
- Kivisild T. 2015, Maternal ancestry and population history from whole mitochondrial genomes. *Investig Genet* 6:3.
- Knapp M, Hofreiter M. 2010, Next Generation Sequencing of Ancient DNA: Requirements, Strategies and Perspectives. *Genes (Basel)* 1:227-243.
- Krzewinska M, Bjornstad G, Skoglund P, Olason PI, Bill J, Gotherstrom A, Hagelberg E. 2015, Mitochondrial DNA variation in the Viking age population of Norway. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370:20130384.
- Leigh JW, Bryant D. 2015, POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol Evol* 6:1110-1116.
- Lindahl T. 1993, Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362:709-715.
- Linderholm A. 2016, Ancient DNA: the next generation - chapter and verse. *Biol J Linnean Soc* 117:150-160.
- Llamas B, Valverde G, Fehren-Schmitz L, Weyrich LS, Cooper A, Haak W. 2017, From the field to the laboratory: Controlling DNA contamination in human ancient DNA research in the high-throughput sequencing era. *Sci Technol Archaeol* 3:1-14.
- Malyarchuk B, Litvinov A, Derenko M, Skonieczna K, Grzybowski T, Grosheva A et al. 2017, Mitogenomic diversity in Russians and Poles. *Forensic Sci Int Genet* 30:51-56.
- Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA et al. 2005, Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437:376-380.
- Maricic T, Whitten M, Paabo S. 2010, Multiplexed DNA sequence capture of mitochondrial genomes using PCR products. *PLoS ONE* 5:e14004.
- Mathieson I, Alpaslan-Roodenberg S, Posth C, Szecsenyi-Nagy A, Rohland N, Mallick S et al. 2018, The genomic history of southeastern Europe. *Nature* 555:197-203.
- Mathieson I, Lazaridis I, Rohland N, Mallick S, Patterson N, Roodenberg SA et al. 2015, Genome-wide patterns of selection in 230 ancient Eurasians. *Nature* 528:499-503.
- Mendizabal I, Lao O, Marigorta UM, Wollstein A, Gusmao L, Ferak V et al. 2012, Reconstructing the population history of European Romani from genome-wide data. *Curr Biol* 22:2342-2349.
- Metzker ML. 2010, Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet* 11:31-46.
- Meyer M, Kircher M. 2010, Illumina sequencing library preparation for highly multiplexed target capture and sequencing. *Cold Spring Harb Protoc* 2010:pdb prot5448.
- Modi A, Tassi F, Susca RR, Vai S, Rizzi E, Bellis G et al. 2017, Complete mitochondrial sequences from Mesolithic Sardinia. *Sci Rep* 7:42869.
- Muir P, Li S, Lou S, Wang D, Spakowicz DJ, Salichos L et al. 2016, The real cost of sequencing: scaling computation to keep pace with data generation. *Genome Biol* 17:53.
- Mullis KB, Faloona FA. 1987, Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-350.
- Neparaczki E, Kocsy K, Toth GE, Maroti Z, Kalmar T, Bihari P et al. 2017, Revising mtDNA haplotypes of the ancient Hungarian conquerors with next generation sequencing. *PLoS ONE* 12:e0174886.
- Neparaczki E, Maroti Z, Kalmar T, Kocsy K, Maar K, Bihari P et al. 2018, Mitogenomic data indicate admixture components of Asian Hun and Srubnaya origin in the Hungarian Conquerors. *bioRxiv*.

- Nesheva DV, Karachanak-Yankova S, Lari M, Yordanov Y, Galabov A, Caramelli D, Toncheva D. 2015, Mitochondrial DNA Suggests a Western Eurasian Origin for Ancient (Proto-) Bulgarians. *Hum Biol* 87:19-28.
- Nielsen R, Akey JM, Jakobsson M, Pritchard JK, Tishkoff S, Willerslev E. 2017, Tracing the peopling of the world through genomics. *Nature* 541:302-310.
- Orlando L, Ginolhac A, Zhang G, Froese D, Albrechtsen A, Stiller M et al. 2013, Recalibrating Equus evolution using the genome sequence of an early Middle Pleistocene horse. *Nature* 499:74-78.
- Ortner DJ (2003) Identification of Pathological Conditions in Human Skeletal Remains. Second edn. Academic Press, Elsevier, San Diego
- Paabo S, Poinar H, Serre D, Jaenicke-Despres V, Hebler J, Rohland N et al. 2004, Genetic analyses from ancient DNA. *Annu Rev Genet* 38:645-679.
- Paabo S, Wilson AC. 1988, Polymerase chain reaction reveals cloning artefacts. *Nature* 334:387-388.
- Pajmans JL, Gilbert MT, Hofreiter M. 2013, Mitogenomic analyses from ancient DNA. *Mol Phylogenet Evol* 69:404-416.
- Pinter ZK, Dobrinescu CI, Dragotă A, Kelemen B. 2011, Preliminary Research in Capidava Medieval Necropolis (Topalu com., Constanța County). *Pontica* 44:387-400.
- Poinar HN. 2003, The top 10 list: criteria of authenticity for DNA from ancient and forensic samples. *Int Congr Ser* 1239:575-579.
- QGIS Development Team ( 2016.) QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation.
- R Development Core Team (2016) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Raule N, Sevini F, Li S, Barbieri A, Tallaro F, Lomartire L et al. 2014, The co-occurrence of mtDNA mutations on different oxidative phosphorylation subunits, not detected by haplogroup analysis, affects human longevity and is population specific. *Aging Cell* 13:401-407.
- Reich D, Green RE, Kircher M, Krause J, Patterson N, Durand EY et al. 2010, Genetic history of an archaic hominin group from Denisova Cave in Siberia. *Nature* 468:1053-1060.
- Richards M, Macaulay V, Hickey E, Vega E, Sykes B, Guida V et al. 2000, Tracing European founder lineages in the Near Eastern mtDNA pool. *Am J Hum Genet* 67:1251-1276.
- Rizzi E, Lari M, Gigli E, De Bellis G, Caramelli D. 2012, Ancient DNA studies: new perspectives on old samples. *Genet Sel Evol* 44:21.
- Roberts CA, Manchester K (2005) The Archaeology of Disease Second edn. The History Press, Gloucestershire
- Schatz G, Haslbrunner E, Tuppy H. 1964, Deoxyribonucleic Acid Associated with Yeast Mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 15:127-132.
- Slatkin M, Racimo F. 2016, Ancient DNA and human history. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:6380-6387.
- Steckel RH, Larsen CS, Sciulli PW, Walker PL (2011) Data Collection Codebook for the Global History of Health Project.
- Stolarek I, Juras A, Handschuh L, Marcinkowska-Swojak M, Philips A, Zenczak M et al. 2018, A mosaic genetic structure of the human population living in the South Baltic region during the Iron Age. *Sci Rep* 8:2455.
- Stoneking M (2016) An Introduction to Molecular Anthropology. Wiley, Oxford
- Suzuki R, Shimodaira H (2015) Hierarchical Clustering with P-Values via Multiscale Bootstrap Resampling. R package version 2.0-0.
- Tamura K, Nei M. 1993, Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* 10:512-526.

- Tassi F, Vai S, Ghirotto S, Lari M, Modi A, Pilli E et al. 2017, Genome diversity in the Neolithic Globular Amphorae culture and the spread of Indo-European languages. *Proc Biol Sci* 284.
- Tomory G, Csanyi B, Bogacsi-Szabo E, Kalmar T, Czibula A, Csoz A et al. 2007, Comparison of maternal lineage and biogeographic analyses of ancient and modern Hungarian populations. *Am J Phys Anthropol* 134:354-368.
- Torrioni A, Lott MT, Cabell MF, Chen YS, Lavergne L, Wallace DC. 1994, mtDNA and the origin of Caucasians: identification of ancient Caucasian-specific haplogroups, one of which is prone to a recurrent somatic duplication in the D-loop region. *Am J Hum Genet* 55:760-776.
- Torrioni A, Schurr TG, Cabell MF, Brown MD, Neel JV, Larsen M et al. 1993, Asian affinities and continental radiation of the four founding Native American mtDNAs. *Am J Hum Genet* 53:563-590.
- Trinkaus E, Moldovan O, Milota S, Bilgar A, Sarcina L, Athreya S et al. 2003, An early modern human from the Peștera cu Oase, Romania. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:11231-11236.
- Turchi C, Stanciu F, Paselli G, Buscemi L, Parson W, Tagliabracci A. 2016, The mitochondrial DNA makeup of Romanians: A forensic mtDNA control region database and phylogenetic characterization. *Forensic Sci Int Genet* 24:136-142.
- Vai S, Brunelli A, Modi A, Tassi F, Vergata C, Pilli E et al. 2018, A genetic perspective on Longobard-Era migrations. *bioRxiv*.
- Vai S, Ghirotto S, Pilli E, Tassi F, Lari M, Rizzi E et al. 2015, Genealogical relationships between early medieval and modern inhabitants of Piedmont. *PLoS ONE* 10:e0116801.
- Vai S, Lari M, Caramelli D. 2016, DNA Sequencing in Cultural Heritage. *Top Curr Chem (Cham)* 374:8.
- van Oven M. 2015, PhyloTree Build 17: Growing the human mitochondrial DNA tree. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser* 5:e392-e394.
- van Oven M, Kayser M. 2009, Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Hum Mutat* 30:E386-394.
- Waldron T (2009) Palaeopathology. Cambridge University Press, Cambridge
- Wang C-C, Reinhold SR, Kalmykov A, Wissgott A, Brandt G, Jeong C et al. 2018, The genetic prehistory of the Greater Caucasus. *bioRxiv*.
- Ward JH. 1963, Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function. *J Am Stat Assoc* 58:236-244.
- Weissensteiner H, Pacher D, Kloss-Brandstatter A, Forer L, Specht G, Bandelt HJ et al. 2016, HaploGrep 2: mitochondrial haplogroup classification in the era of high-throughput sequencing. *Nucleic Acids Res* 44:W58-63.
- Willerslev E, Cappellini E, Boomsma W, Nielsen R, Hebsgaard MB, Brand TB et al. 2007, Ancient biomolecules from deep ice cores reveal a forested southern Greenland. *Science* 317:111-114.
- Willerslev E, Cooper A. 2005, Ancient DNA. *Proc Biol Sci* 272:3-16.
- Yang DY, Eng B, Wayne JS, Dudar JC, Saunders SR. 1998, Technical note: Improved DNA extraction from ancient bones using silica-based spin columns. *Am J Phys Anthropol* 105:539-543.
- Young DL, Huyen Y, Allard MW. 1995, Testing the validity of the cytochrome B sequence from cretaceous period bone fragments as dinosaur DNA. *Cladistics* 11:199-209.

## Mulțumiri

*Doresc, în primul rând, să îi mulțumesc d-lui Prof. dr. Horia Banciu, conducătorul științific al tezei mele, pentru îndrumare, sprijin, sugestiile valoroase și încurajările oferite pe parcursul pregătirii acestei lucrări. De asemenea, îi sunt foarte recunoscătoare doamnei CSI dr. Annette Damert pentru ajutorul oferit în dobândirea competențelor de biologie moleculară și îndrumarea din primii ani ai stagiului doctoral. Doresc să-mi exprim recunoștința față de Acad. Octavian Popescu pentru că mi-a oferit ocazia să lucrez în laboratoarele Centrului de Biologie Moleculară din cadrul Institutului de Cercetări Interdisciplinare în Bio-Nano-Științe. Sunt profund recunoscătoare doamnei dr. Beatrice Kelemen pentru că mi-a inspirat entuziasmul pentru bioarheologia moleculară, pentru ajutorul ei în proiectarea studiului și în interpretarea rezultatelor. Îi sunt recunoscătoare doamnei dr. Alina Sesărman pentru sugestiile utile.*

*Aș dori să le mulțumesc tuturor membrilor comisiei de doctorat pentru că au acceptat să îmi evalueze lucrarea.*

*Sunt foarte recunoscătoare domnului Prof. dr. David Caramelli și grupului său de cercetare pentru că mi-au oferit posibilitatea să lucrez în Laboratorul de Antropologie Moleculară și Paleogenetică de la Universitatea din Florența (Italia). Îi mulțumesc Alessandrei (dr. Alessandra Modi) pentru ajutorul oferit în timpul experimentelor de laborator și pentru analizele bioinformatică. Aș dori să le mulțumesc tuturor pentru colaborare, precum și pentru contribuțiile științifice valoroase și comentariile utile primite în timpul pregătirii manuscriselor asociate acestei teze. Sunt, de asemenea, recunoscătoare doamnei Prof. dr. Concepcion de la Rúa pentru că a acceptat efectuarea analizelor necesare în vederea autentificării unor rezultate în laboratorul de ADN vechi de la Universitatea din Țara Bascilor (UPV / EHU, Spania), iar doamnei dr. Montserrat Hervella pentru marele ajutor oferit în efectuarea acestora.*

*Mai mult, vreau să mulțumesc tuturor colegilor mei de la Departamentul de Biologie Moleculară și Biotehnologie și de la Institutului de Cercetări Interdisciplinare în Bio-Nano-Științe. În mod special, îi sunt recunoscătoare doamnei CSII dr. Adriana Lazăr pentru sfaturi, prietenie și discuții utile. Timpul petrecut în laborator nu ar fi fost atât de plăcut fără colegii mei Cristina Mircea, Alexandra Gînguță, Avar Lehel Deneș și Paul Bulzu, cărora le sunt recunoscătoare pentru sugestiile, ajutorul și discuțiile plăcute, în special în momentele stresante. Sunt recunoscătoare pentru sprijinul lor moral și prietenia constantă.*

*Aș dori să mulțumesc tuturor arheologilor care au contribuit la această lucrare și pentru momentele plăcute petrecute la Capidava, în timpul campaniilor arheologice de vară.*

*Sunt cu adevărat recunoscătoare tuturor prietenilor pentru momentele de neuitat și pentru că mi-au fost mereu alături.*

*În cele din urmă, dar nu în ultimul rând, aș dori să mulțumesc familiei mele, pentru sprijinul necondiționat, înțelegere și pentru că m-au încurajat în permanență să îmi urmăresc pasiunile.*

### **Lista lucrărilor științifice incluse în teză**

- Rusu I, Modi A, Vai S, Pilli E, Mircea C, Radu C, Urduzia C, Pinter ZK, Bodolica V, Dobrinescu C, Hervella M, Popescu O, Lari M, Caramelli D, Kelemen B (2018) Maternal DNA lineages at the gate of Europe in the 10<sup>th</sup> century AD. *PLOS One* 13:e0193578. (IF 2.766/2017; AIS 1.0/2017)
- Rusu I, Paica I, Vulpoi A, Radu C, Mircea C, Dobrinescu C, Bodolica V, Kelemen B (2018) Dual DNA-protein extraction from human archaeological remains. *Archaeol Anthropol Sci* <https://doi.org/10.1007/s12520-018-0760-1> (IF 2.414/2017; AIS 0.828)
- Rusu I, Modi A, Radu C, Mircea C, Vulpoi A, Dobrinescu C, Bodolică V, Potârniche T, Popescu O, Caramelli D, Kelemen B (2019) Mitochondrial ancestry of medieval individuals carelessly interred in a multiple burial from southeastern Romania. *Sci Rep*, 9, 961, doi:10.1038/s41598-018-37760-8 (IF 4.122/2017; AIS 1.356/2017)

### **Lista lucrărilor științifice neincluse în teză**

- Mircea C, Vulpoi A, Rusu I, Radu C, Pârvu M, Kelemen B (2018) Exploring post-excavation degradation potential of fungal communities associated with archaeological human remains. *Archaeometry* <https://doi.org/10.1111/arcm.12438> (IF 1.545/2017; AIS 0.497)
- Mățău F, Matricală AL, Bele A, Rusu I, Gorgan DL, Bolohan N (2017) Diagenetic analysis and historical interpretations. Case studies from eastern Romania. *Studia Antiqua et Archaeologica* 23(2): 227-247.