



UPPSALA
UNIVERSITET

In Vitro Köttproduktion

En Djur och Miljövänlig Framtid

Nicole Loginger

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, höstterminen 2013
Institutionen för biologisk grundutbildning,
Uppsala universitet

Sammanfattning

Stamcells forskning har öppnat nya möjligheter framförallt inom medicin. Ett nytt område inom stamcells forskningen är in vitro köttproduktion vilket innebär syntetiskt framställt kött. Detta nya område kan möta det ökade kravet på kött och hindra onödig djurslakt och samtidigt vara miljövänligt. I detta arbete förklaras begreppet stamceller och undersöker in vitro köttproduktion samt granskar om detta är något för framtiden. Detta görs genom att initialt beskriva de transkriptionsfaktorer som kontrollerar muskelstamceller att utföra celledelning och differentiering samt faktorer från muskelstamcellnischen. Kunskap om dessa faktorer ger ledtrådar till lämpligt medium som muskelstamceller kan växa på och producera kött. Arbetet belyser några viktiga frågetecken och svårigheter som återstår för att skapa 3-dimensionellt (3D) kött. Ett utav de svåraste problemen är att framställa ett optimalt medium som dessutom är miljövänligt och billigt. Detta för att i slutänden kunna sälja syntetiskt kött till ett rimligt pris och uppnå målet med in vitro kött. Slutsatsen är att det är för tidigt att kunna avgöra om in vitro kött kommer att uppnå förhoppningarna eftersom det är många stora hinder kvar att överkomma. Dessutom kvarstår frågan hur många som skulle vilja konsumera in vitro kött eftersom detta kan kännas främmande. Samtidigt är det många som är helt emot stamcells forskning men förhoppningsvis är stamceller ett mer accepterat begrepp i framtiden.

Problemställning

Kött är en stor del av människans diet och den blir enbart större. I västvärlden år 2000 åt varje person 83 kg kött per år och denna siffra kommer kontinuerligt öka (The state of food and agriculture 2009, 2009). Det är känt att lantbruket bidrar med 18 % av växthusgaserna och utrymmet för ökad köttproduktion är begränsad (Steinfeld et al., 2006). Under de senaste åren har intresset för nya lösningar på köttproblemet börjat undersökas och en utav dessa är in vitro köttproduktion. I det här arbetet ska in vitro köttproduktion analyseras och om det är något som kan användas i framtiden. För att få en förståelse för in vitro köttproduktion kommer arbetets första del ge en introduktion till stamceller. Därefter gå arbetet in på in vitro köttproduktion samt de faktorer som måste uppnås för att skapa ett funktionellt medium. Arbetet avslutas med en diskussion om in vitro köttproduktions framtidsmöjligheter.

Stamceller

Fenomenet stamceller har länge varit känt och under de senaste tjugo åren har stamceller visat sig vara grunden till framtidens bioteknologi. Denna teknologi har potential att lösa många svårigheter, allt från cancerbehandling till odling av organ. Stamcellers betydelse för vårt samhälle kommer vara stor, dock finns många hinder i vägen.

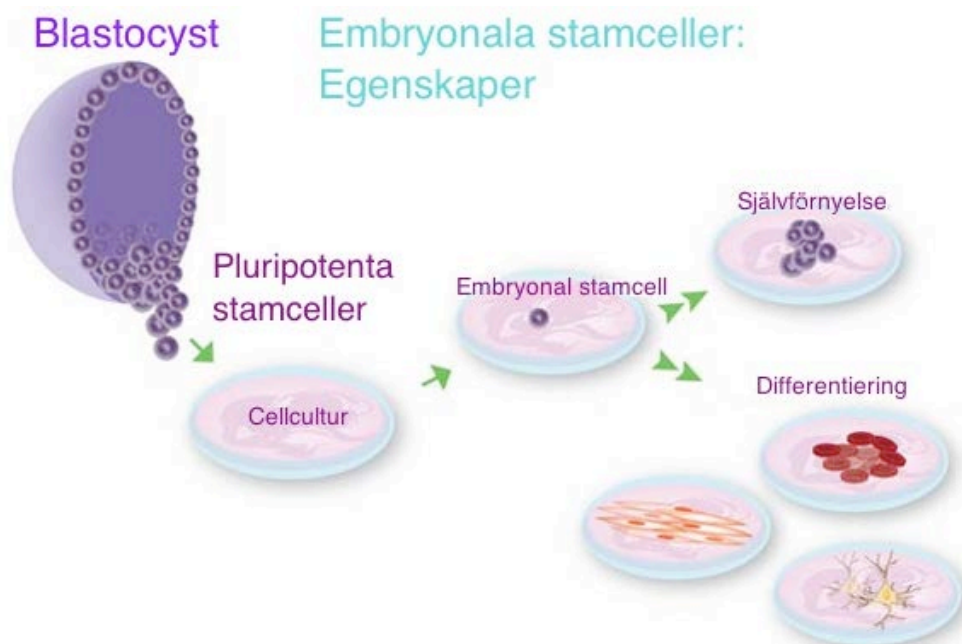
Människan har över 200 olika typer av celler där alla har sina uppgifter (California Institute for Regenerative Medicine, 2013). Röda blodkroppar transporterar syre i blodet och nervceller skickar signaler när de blir stimulerade. Specialiserade celler kan enbart dela sig ett antal gånger eller inte alls. Detta är ett kontrollsystem och konsekvensen är ett krav på tillförsel av specialiserade celler (Duguid, 2011; Stockdale och Topper, 1966, pp. 1283–1289). Definitionen av stamceller är att de funktionellt inte är begränsade att dela sig (självförnyelse) och att de kan differentiera

(mogna) till en annan celltyp (Weissman et al., 2001). Det finns olika typer av stamceller och klassifikationen bestäms genom deras potential att självförnya sig och differentiera (Gearhart et al., 2009, p. 4).

Stamcellstyper

När en spermie befruktar ett ägg bildas en cell (zygot) som kommer bli den nya organismen och moderkakan. Denna cell är *totipotent*, alltså den kan dela sig oändligt många gånger (odifferentierade dotterceller) och differentiera till alla celltyper (Van de Velde et al., 2008). När den totipotenta cellen börjar dela sig bildas en blastocyst (fig 1) där det yttersta lagret av celler, trofektodermceller, bildar moderkakan. Cellerna innanför trofektodermcellerna är de celler som kommer bli själva organismen. Dessa celler är *embryonala* stamceller (ES) och är *pluripotenta* (Duguid, 2011).

Pluripotenta stamceller har samma egenskaper som totipotenta stamceller fast de kan inte skapa moderkakan. ES-celler är lätta att komma åt i blastocysten under trofektodermcellerna och de går att odla i en petriskål. Detta gör att ES-celler är eftertraktade av forskningsvärlden (Borowski et al., 2011, pp. 4–5). Problemet med mänskliga ES-celler är etiken som talar emot att förstöra embryon vilket leder till motstånd.



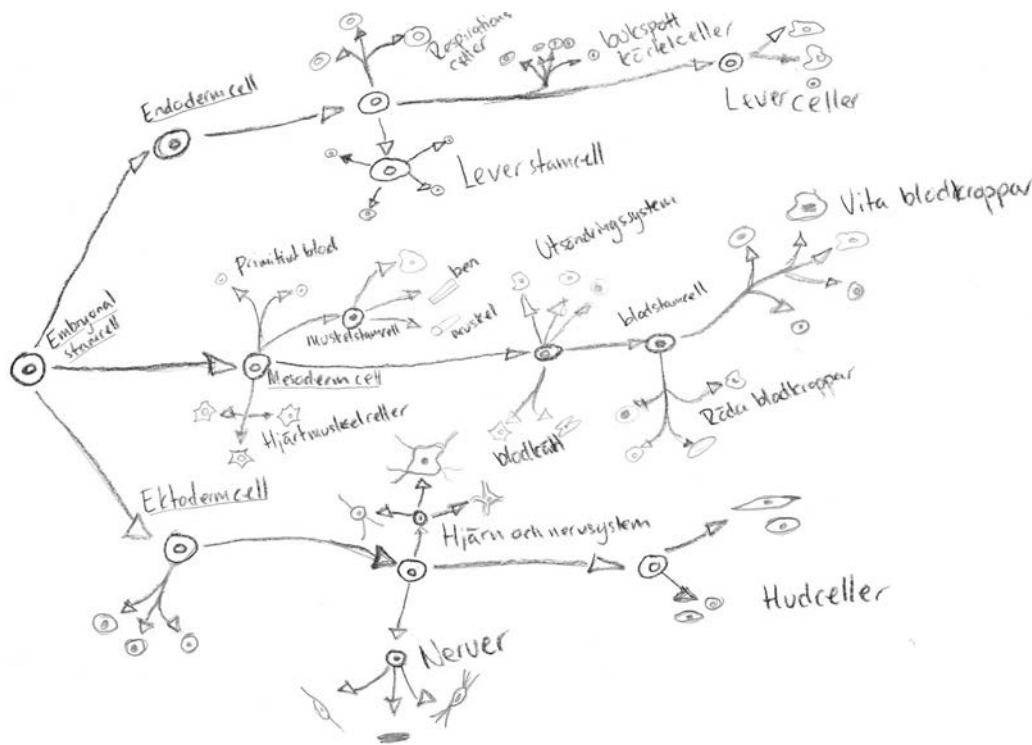
Figur 1. Sammanfattning av embryonala stamcellers egenskaper, differentiering och självförnyelse. Från blastocysten kan pluripotenta stamceller isoleras och manipuleras. Modifierad av Loginger (Borowski et al., 2011).

Under den embryonala utvecklingen bestäms vilka ES-celler som ska bilda vad i organismen genom cellernas placering. De enskilda ES-cellerna blir indelade i skikt som kallas *groddblad*. I högre organismer bildas tre groddblad, *ektoderm*, *mesoderm* och *endoderm*. De celler som är i ektodermet kommer differentiera huvudsakligen till hudceller och nervsystemet. Celler i mesodermet kommer bilda muskler, ben, benmärg och blod. Endoderma celler ger upphov till alla organ inklusive hela matspjälkningsystemet (Gadue et al., 2005, pp. 955–964; Haeckel, 2002).

I en vuxen individ har det inte hittats några pluripotenta stamceller. Däremot finns det fortfarande ett krav på tillförsel av nya celler som tidigare har nämnts. De pluripotenta stamcellerna har differentierat till *adult* stamceller (AS). Dessa stamceller är *multipotenta* vilket innebär att de enbart kan differentiera till vissa typer av celler. Det finns multipotenta stamceller i till exempel ryggmärgen som enbart kan differentiera till vita/röda blodkroppar (Till och McCulloch, 1961) och andra multipotenta stamceller differentierar till nya hudceller (Toma et al., 2001). Kravet på tillförsel av nya differentierade celler är hög i tarmen och i lungor på grund av den stora celldöden där. När en cell dör ersätts den direkt genom att stamceller i botten på tarmen känner av detta och delar sig. Dessa stamceller, till exempel i tarmen som enbart kan bli en celltyp, kallas för *progenitorceller* och kan enbart utföra självförnyelse ett begränsat antal gånger (Alison och Islam, 2009).

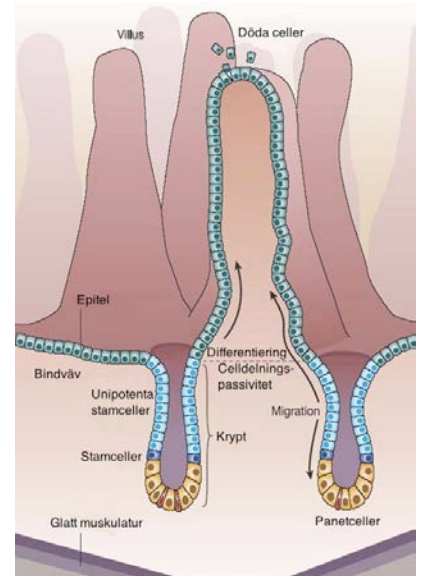
Differentiering

När stamceller delar sig har de två vägar att gå; självförnyelse eller differentiering. Differentiering betyder att cellen specialiserar (anpassar/mognar) till en annan typ av cell. Beroende på vilken differentieringspotential (potents) cellen har avgör vilka celltyper den kan differentiera till. Det som gör att en stamcell differentieras till en specifik celltyp forskas det mycket om och det finns många frågetecken kvar. Däremot finns en generell förståelse som tyder på att miljön cellen är i påverkar differentieringen. Det är viktigt att komma ihåg är att alla celler i kroppen har samma genetiska material, alltså samma genom. Detta innebär att det inte är någon förprogrammering som har skett utan faktorer i kroppen ansvarar för stamcellens öde (Campbell et al., 2008, pp. 366–373). Ett exempel är endoderm, ektoderm och mesoderm, där ES-celler specialiserar sig till olika vävnader beroende på vilket skikt de hamnar i (se fig 2).



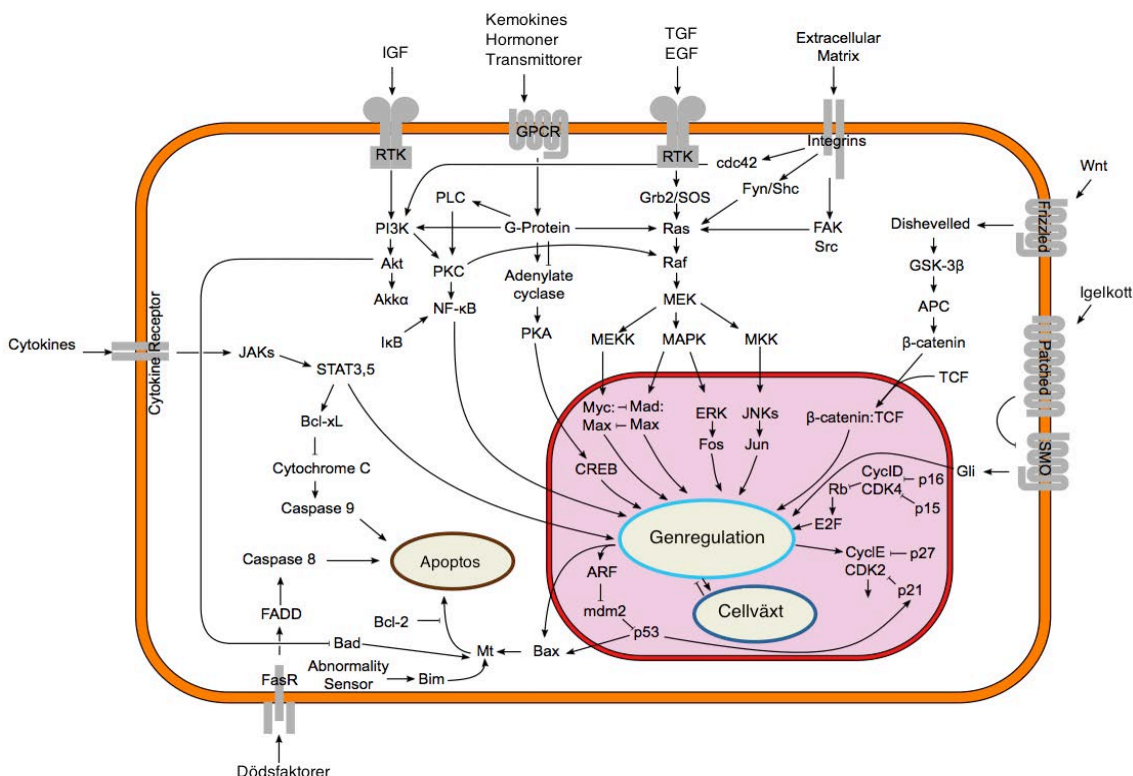
Figur 2. Skiss på stamcellers differentieringspotential. Modifierad av Loginger (Duguid, 2011).

Stamcellens mikromiljö och de faktorer som krävs för att cellen ska utvecklas kallas för *stamcellsnisch* (habitat). Nischen kan innehålla extracellulärmatris (ECM), hormoner, blodomlopp, närliggande celler, basalmembran och så vidare (Gearhart et al., 2009, p. 61). Dessa komponenter är viktiga för att reglera stamcellen som annars kan dela sig okontrollerat och leda till cancer. Hur komponenterna påverkar och signalerar till stamcellerna skiljer sig åt men det kan vara allt från signalmolekyler till cell-cellkontakt. Ett exempel på en stamcellsnisch är villus som bygger upp tarmen. Tarmen har en hög grad av celldöd vilket innebär att stamceller konstant måste tillföra nya differentierade celler. Stamcellerna finns skyddade i veck (krypt) och ”känner” (signalfaktorer) när tarmceller dör på toppen av villus (se figur 3). Detta gör att stamcellerna delar sig och differentieras vilket puttar cellraden uppåt och förhindrar nedbrytning av komplexet. Stamcellerna måste dela sig 200-300 gånger per dag för att detta ska uppnås (Gearhart et al., 2009, pp. 69–70).



Figur 4 Uppbyggnaden av villus. Stamceller delar sig och differentieras sedan vilket skapar en migration av celler som ersätter döda celler. Modifierad av Loginger (Reya och Clevers, 2005).

Hur en signalmolekyl påverkar cellens genuttryck är en komplex kaskad av händelser. Förenklat tas signalen emot av en membranreceptor vars struktur ändras. Detta aktiverar ett protein i cytoplasman genom fosforylering. Detta protein i sin tur fosforylerar ett annat protein och en kaskad av fosforyleringar sker tills en transkriptionsfaktor aktiveras i cellkärnan (se fig 4). Beroende på vilken transkriptionsfaktor som aktiveras upp- och nerregleras en mängd olika gener. Den nya genproduktionen (olika protein) resulterar i cellaktivitet såsom differentiering och självförnyelse eller cellpassivitet där cellen går in i Go (Campbell et al., 2008, pp. 214–215). Skillnaden mellan en stamcell och en specialiserad cell är vilka gener som är aktiva och inaktiva. Genprodukten avgör alltså hur cellen betar sig och faktorer i cellnischen bestämmer vilka gener som uttrycks (Weissman et al., 2001).



Figur 5. Hur faktorer påverkar en cell och andra faktorer. Ett exempel på hur komplex signalering kan vara. Modifierad av Loginger (The Cybertory Project, 2010).

För att beskriva hur stamcellerna kontrolleras måste det finnas en förståelse för faktorer i stamcellsnischen. Dock är detta system mer komplext än det ter sig vid första intrycket eftersom faktorerna påverkar varandra i olika grader (Li och Xie, 2005).

Inducerad pluripotent stamcell

Länge trodde forskare att differentieringen enbart kunde gå åt ett håll, från stamceller till specialiserade celler (se fig 2). År 2006 revolutionerades stamcellsforskningen när japanen Yamanaka och hans team lyckades återskapa pluripotenta stamceller från hudceller. De hittade gener som kontrollerade att hudcellen var en hudcell och när dessa inaktiverades visade det sig att cellen hade egenskapen pluripotens. Generna var oct4, sox2, klf4 och c-myc som kodar för olika transkriptionsfaktorer. Denna nya gren av stamceller döptes till *inducerade pluripotenta stamceller (IPS)* (Takahashi och Yamanaka, 2006). Hudceller var inte de enda cellerna som kunde transformeras tillbaka till pluripotenta stamceller. Blodceller, keratinocyter, lymfocyter, magceller och leverceller har differentierats tillbaka till stamceller (Aasen et al., 2008; Aoi et al., 2008; Hanna et al., 2009; Loh et al., 2009) och teoretiskt kan nästan alla celltyper bli IPS-celler.

Det som gör IPS teoretiskt användbart är inom medicin där personer med behov av nya organ kan få det med hjälp av sina egna celler. Eftersom det är individens egna celler minskar risken för bortstötning dramatiskt. Dessutom finns inga etiska problem med användning av och forskning på IPS-celler såsom vid ES-celler. I dagsläget går det inte att kontrollera IPS-cellerna vilket resulterar i cancer. Dock är detta område enbart några år gammalt och med mer forskning har IPS-celler en framtid inom medicin (Sköld, 2012)

In vitro köttproduktion

Stamcellsforskningen har börjat öppna många nya dörrar, framförallt inom medicin. Ytterligare en dörr har glidit på glänt och det är området *in vitro köttproduktion*. In vitro (latin "i glas") köttproduktion betyder odlat kött, alltså kött som syntetiskt skapats i ett laboratorium. Framtidsutsikterna i detta fält är att kunna producera välsmakande, miljövänligt kött som går att köpa i butiker för ett rimligt pris. Detta innebär att det kontinuerliga ökade kravet på kött skulle mättas samtidigt som inga djur behöver offras.

Historia

In vitro köttproduktion startade sin resa när Willem van Eelen, född 1923 i Holland, under andra världskriget blev stationerad i Indonesien. Inte långt efter intog japaner Indonesien och Eelen fängslades. I en intervju med The New Yorker berättade Eelen hur illa japanerna bemötte fångarna men behandlade djuren ännu värre. Hunger var vardag och när amerikanerna befriade Indonesien var Eelen mycket nära att svälta ihjäl. Efter kriget började Eelen studera och blev fixerad vid tanken att odlat kött kunde vara lösningen på onödigt djurplågeri och hunger. In vitro köttproduktion blev hans livsuppgift och många skrattade åt hans idé. När stamcellernas potential kom till ytan 1981 (Evans och Kaufman, 1981) tog Eelens forskning fart och 1999 fick han patent på in vitro köttproduktion (Specter, 2011). Under 2004 initierade Eelen ett projekt "in vitro meat" med stöd från holländska staten. Vid 85 års ålder (år 2008) överlämnade Eelen projektet till Mark Post som den 5 augusti 2013 presenterade den

första in vitro hamburgaren. Prislappen var 250,000 euro vilket är cirka 2,2 miljoner kr (Post, 2013). Detta kan vara starten på något extraordinärt och forskning på syntetiskt odlat kött sker nu.

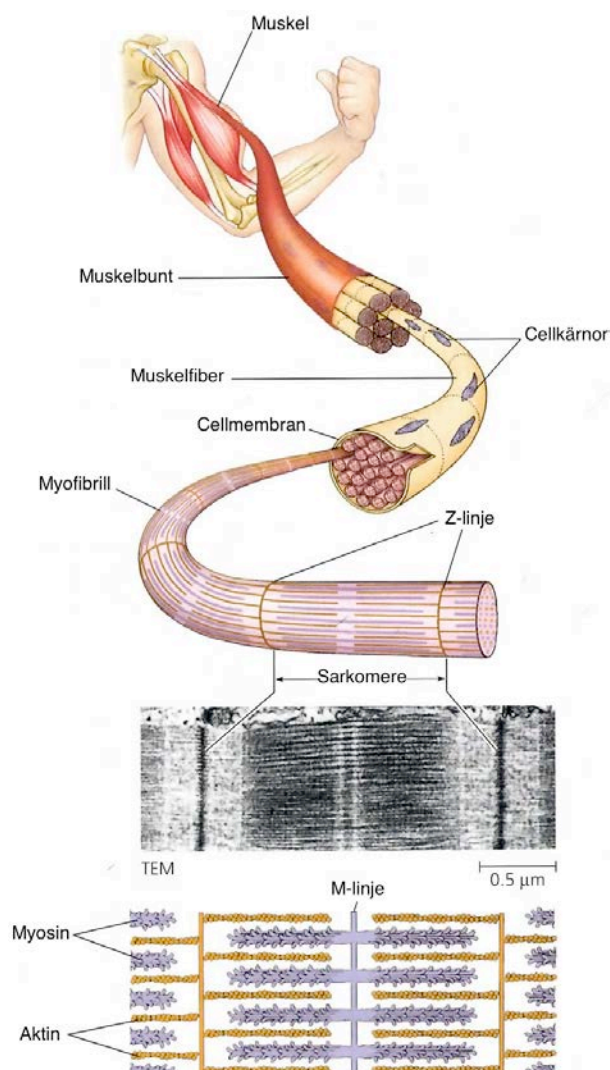
Muskel och satellitceller

Under många år har det funnits flera definitioner av vad kött är, men 2001 definierade EU kött som skelettmuskulatur från däggdjur eller fjäderfän (Albért, 2001). Det som bygger upp muskler är muskelceller (myocyt) som fungerar och betar sig annorlunda än normala celler. Muskelceller har cylinderformade organeller som kallas *myofibriller* som är uppbyggda av *sarkomerer*. Sarkomerer är enheter som kan dra ihop sig genom att motorproteinet *myosin* "klättrar" på aktinfilament vilket resulterar i muskelns kontraktion och organismens rörelseförmåga (se fig 3). När muskler bildas sker en fusion mellan många skelettmuskelstamceller (MuS) vilket resulterar i en lång cell som blir en muskelfiber (myogenesis). Detta medför att muskelfiber har många cellkärnor över hela dennas längd (Campbell et al., 2008, pp. 1105–1106).

För att kunna odla kött krävs MuS-celler men på grund av den låga celledningen i muskler var det svårt att identifiera regenererande celler. Mononukleära celler som låg utsprida längs muskelfibrerna under basalmembranet urskildes 1961 och döptes till *satellitceller* (Mauro, 1961). Satellitceller hade potential att kunna vara MuS-celler vars uppgift är att skapa och regenerera skadad adult muskulatur.

Det tog nästan 40 års forskning för att visa att detta var fallet (Seale och Rudnicki, 2000). En utav dessa studier studerade Pax7, en transkriptionsfaktor involverad i myogenesis, i möss. När Pax7 inaktiverades försvann alla satellitceller och mössen dog efter ett par månader av svåra muskelskador (Seale et al., 2000). Denna studie visar att Pax7 kännetecknar och kontrollerar satellitcellerna och att den försvinner vid differentiering till muskelceller.

Andra faktorer som kännetecknar och kontrollerar satellitceller är *myogeniska regulatoriska faktorer* (MRF). Dessa är ett bas-helix-loop-helix-protein (transkriptionsfaktorer) som reglerar myogenesis och muskelreparation genom att binda till relevanta gener och kontrollera dem. Myogenin, MRF4, MyoD och Myf5 tillhör MRF och är essentiella i muskelutveckling (Gearhart et al., 2009, p. 254). Om både MyoD och Myf5 är inaktiverade i möss saknar de helt skelettmuskulatur men är normala om någon av myoD och myf5-generna är aktiverade (Rudnicki et al., 1993).



Figur 3. Schematisk bild över hur muskler är uppbyggda. Modifierad av Loginger (Campbell et al, 2008)

Pax7 och MRF kontrollerar när och hur satellitceller differentierar till ny muskelvävnad. Dessa gener stängs av när cellen har differentierat sig och vid deras inaktivering aktiveras andra gener, till exempel PW1. PW1 är ett stort protein som innehåller mängder av zinkfinger och en enorm repetitiv struktur av prolin (Gearhart et al., 2009, pp. 253–254). Däremot är det viktigt att inte glömma att MuS måste kunna utföra självförnyelse för att inte försvinna från vävnaden. I en studie från 2005 undersöktes satellitcellernas självförnyelsepotential. I studien isolerades från möss en muskelfiber med β -galaktosidase som reportermarkör och 7 satellitceller med Pax7 som markör. Efter 3 veckor färgades proverna och muskelfiberkärnorna och satellitceller kunde urskiljas med hjälp av markörerna. Resultatet var extraordinärt, över 100 nya muskelfibrer med tusentals cellkärnor hade regenererats. Dessutom hade satellitcellerna gjort otroligt många nya kopior av sig själva och dessa hittades över alla muskelfibrer (Collins et al., 2005). Detta försök var ett utav de första som lyckades få satellitceller att dela sig i mängder in vitro.

Satellitnisch

Med satellitcellernas självförnyelsepotential och egenskap att differentiera till ny muskelvävnad är de en klar kandidat att användas inom in vitro köttproduktion. Frågan är om det finns möjligheter att odla dessa i tillräckligt stor skala för att nå målet med köttproduktionen. För att få en tillräcklig mängd krävs att cellerna inte direkt differentierar utan delar sig kontinuerligt där sista steget är differentiering. Annars finns risken att alla satellitceller differentierar vilket resulterar i en liten skala. För att kontrollera satellitceller och skapa ett medium för cellodling är det en nödvändighet att förstå och återskapa deras nisch. In vivo (latin ”med det levande”, syftar på biologiska processer i naturligt tillstånd) finns extracellulärmatrix (ECM), neurologisk stimulans, tillväxtfaktorer, basalmembran, blodomlopp, omgivande celler, hormoner, dynamisk rörelse osv. För att muskler ska växa tredimensionellt (3D) är dessa faktorer viktiga och cellernas mikromiljö borde därför undersökas (Post, 2012).

Basalmembran

Basalmembranet har visat sig vara en viktig komponent i stamcells-nischen och tillhör ECM (Spradling et al., 2001). Basalmembranet är en tunn hinna som omgivande celler producerar och består av typ IV kollagen, laminin och proteoglykaner. Dessa är bundna till varandra med entaktin och formar en struktur med bindningsfaktorer som interagerar med cellerna. Basalmembranets form kan ändras beroende av omgivande cellers aktivitet (under utvecklingen eller vid skada), det påverkar satellitcellens form, migration och interaktion med andra celler. Celler känner av basalmembranet med *integriner*. Integriner är receptorer som finns i en stor variation och erbjuder en kommunikation med cellens omgivning. De sitter fast i cellens cytoskelett som sedan går igenom cellmembranet vilket möjliggör interaktion med basalmembranets proteiner (Boonen och Post, 2008). I satellitceller är integrinen alfa7 vanlig och interagerar med dystroglukan och laminin. När den aktiveras har den visat tecken på att påverka cellens regenerativa förmåga (Xiao, 2003). Korrelation mellan aktivering av integrinen alfa3 och satellitcellers migrering och differentiering har varit stark. När cellen aktiveras och ska utföra dessa aktiviteter bildar alfa3 ett komplex med integrin beta1 subenheten och sheddaset ADAM12 (A disintegrin and metalloproteinase,

membranbundet protein som klyver eller aktiverar transmembranprotein) (Brzoska et al., 2006). Andra viktiga komponenter som har visat sin relevans är laminin-2 och syndecan-4. Laminin-2 och Syndecan-4 är komponenter i basalmembranet och om en utav laminin-2 subenheter tas bort (knockout alfa2 i möss) försvinner nästan allt basalmembran och satellitcellerna blir markant färre (Girgenrath et al., 2005). Syndecan-4 känner igen *fibroblasttillväxtfaktorer* (FGT, fibroblast growth factor) och har inverkan på satellitcellernas celldelning och differentiering (Rauch, 2005).

Cellkommunikation

Cellkommunikation kan ske på olika sätt och när celler är långt ifrån varandra skickas hormoner och andra former av signalsubstanser. För att få satellitceller att dela på sig är tillväxtfaktorer av intresse. Kroppen skickar olika tillväxtfaktorer vid skada av muskler som aktiverar satellitcellerna. Dessa faktorer inkluderar *omvandlade tillväxtfaktor-beta* (TGF-beta, transforming growth factors beta), FGT, *hepatocytillväxtfaktorer* (HGT, hepatocyte growth factor) och *insulinlikattillväxtfaktor-1* (IGF-1, insuline-like growth factor-1)(Post, 2012).

TGF-beta har visat sig inhibera celldelning, differentiering samt aktivera programmerad celldöd. TGF-beta utsöndras av makrofager och bildar ett komplex med serin/treonin-kinas som finns på satellitcellers membran. Serin/treonin-kinaset fosforylerar proteinet r-SMAD i cellen. R-SMAD bildar ett komplex med SMAD och SMAD4 som migrerar in i cellkärnan och fungerar som en transkriptionsfaktor och påverkar gener som Myf5 och MyoD (Furutani et al., 2011; Massouh and Hata, 1997).

En viktig tillväxtfaktor som aktiverar muskulurreparation är HFG och IGF-1 som utsöndras av ECM vid skada. HFG känns igen av c-metreceptorn som sätter igång en treosinkinaskaskad som aktiverar passiva satellitceller (Tatsumi et al., 1998). Endast i HGFs närvaro kan FGF vara aktivt där dess uppgift är att stimulera celldelning samt differentiering genom FGFR-receptorn (Boonen och Post, 2008). Om FGFR-receptorn muteras kan inte möss laga skadad muskulatur (Floss et al., 1997). IGF-1 ökar differentiering samt muskelregenerering i möss. Exakt hur detta går till är ännu okänt men IGF-1 receptor har identifierats som IGFR. IGF är dessutom essentiellt och vid inaktivering dör möss vid födsel på grund av svårt defekta muskler (Powell-Braxton et al., 1993).

Cell-cellkontakt

Närliggande celler signalerar till varandra och vid skada skickas specifika signalsubstanser ut (Boonen och Post, 2008). Muskelfibrernas signalsubstanser har visat sig påverka satellitceller i stor utsträckning. Vid muskelskada krävs att satellitcellerna delar sig och differentieras för att laga skadan. En signalmolekyl som gör just detta är *kväveoxid* (NO, nitric oxide) som produceras av muskelfibrer via kväveoxidsyntas (NOS, nitric oxide synthase). NOS stimuleras vid skada och NO förstärker HGF men hur detta sker är ännu oklart (Tatsumi, 2006). För att laga skadade muskelfibrer måste satellitcellerna migrera till det utsatta området. Skadade muskelfibrer utsöndrar *stromacellshärledningsfaktor-1* (SDF-1, stromal cell-derived factor1) som tas upp av CXC kemotaxisreceptor-3 (CXCR3, CXC chemokine receptor-3). Satellitcellen kommer att dras till där det är högst koncentration av SDF-1

och därav differentiera och återskapa muskelfiber (Ratajczak et al., 2003). När satellitcellerna är i kontakt med skadan används integrinen väldigt sen antigen-4 (VLA4, very late antigen-4) som känner igen vaskulär celladhesionmolekyl-1 (VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1) som är en integrinreceptor. VCAM-1 finns på muskelfibrernas cellmembran och aktiveras vid skada. När VLA4 kommer i kontakt med VCAM-1 utför satellitcellen myogenes och lagar muskelfibern (Rosen et al., 1992).

VLA4/VCAM-1systemet är ett exempel på hur cell-cellkontakt påverkar satellitceller. Det finns andra typer av receptorer som läser av denna typ av kontakt. En utav dessa extracellulära transmembranreceptorer har visat sin relevans i celldelning, differentiering och aktivering och kallas för *notch*. När notch aktiveras sker en mängd komplexa händelser som leder till genreglering (kaskad). Detta system kallas notch-signaltransduktion och finns dessutom i andra vävnader och aktiveras vid bindning till specifika ligander. Liganderna sitter på membranet på andra celler till exempel T-celler från immunförsvaret (Artavanis-Tsakonas et al., 1999). I satellitcellsnischens fall är förståelsen för notchkaskaden inte fullständig. Däremot har studier visat att när notch-receptorn blir aktiverad kan den upp och ner reglera FGT, MRF (Nofziger et al., 1999) och genen NUMB (producerar numb-homolog protein som reglerar differentiering). En ligand som aktiverar notch är delta-1 som gör att satellitcellen delar sig, detta uppstår vid muskelskada (Conboy och Rando, 2002).

Tabell 1. Sammanfattning av faktorer som påverkar i satellitcellnischen.

Signal	Källa	Receptor	Funktion/referens
TGFbeta	Makrofag	Serin/treonin-kinas	Programmerad celldöd, inhibering av celldelning och differentiering (Massaous and Hata, 1997)
FGF	Satellitcell/ECM	FGFR	Celldelning, inhibering av differentiering (Dimario et al., 1989)
HGF	ECM	Alfa-Met	Aktivering (Tatsumi et al., 1998)
IGF	Cirkulation/ECM	IGFR	Celldelning, differentiering (Machida and Booth, 2007)
Laminin	Basalmembran	Intergin	ECM-signalering, celladhesion, passivt stadium (Yuko et al., 1997)
Syndecan	Basalmembran	FGT, intergin	Celldelning, differentiering (Rauch, 2005)
SDF	Myofiber	CXCR4	Migration (Ratajczak et al., 2003)
VLA4	Myofiber	VCAM	Myoblastfusion (Rosen et al., 1992)
NO	Myofiber	-	Aktivering, passivt stadium (Tatsumi, 2006)
Delta-1	Satellitcell	Notchreceptor	Celldelning, självförnyelse (Conboy et al., 2007)

Dynamisk rörelse

På all muskelvävnad finns nervceller som stimulerar fibrerna att dra ihop sig. Denna dynamiska rörelse och signalering saknas i en petriskål. För att undersöka om muskelcellers tillväxt är beroende av dessa faktorer har flera studier försökt efterlikna dem. Radisic studie från 2004 använde elektroder för att tillföra elektrisk stimulans till hjärtmuskelceller. De byggde en liten glaskammare som innehöll 2 kolstavar (elektroder) med 1cm mellanrum. Elektroderna var kopplade med platinatråd till en pacemaker och utav silikon gjordes 6 brunnar som placerades mellan elektroderna. Brunnarna innehöll omogna monocellager av hjärtmuskelceller som blev stimulerade varje 2 millisekunder med 5 V/cm, 1 Hz. Dessa fick växa i 8 dagar och jämfört med kontrollkulturer växte de med stimulans 7 gånger mer (Radisic et al., 2004). Det diskuterades vad som skulle vara den optimala rytmen för optimal tillväxt. Yamasaki och hans team studerade 3D-muskelfibrer i mikroskop och de observerade att fibrerna var synkade mellan 0,5 och 5 Hz. Vid 10Hz krampade dock cellerna och kunde inte fortsätta röra sig (Yamasaki et al., 2009).

Medium

För att skapa ett optimalt medium behövs en stor kunskap om de faktorer som krävs för att satellitceller ska kunna växa kontinuerligt. Dessa faktorer inkluderar biokemiska signaler (som tidigare har diskuterats), näring samt en byggnadsställning som cellerna kan växa på. Det är inget problem att odla monolager av muskelceller i en petriskål, de får näring från mediet och syre från atmosfären. Däremot blir produktionen för lågskalig och kan inte ta syntetiskt odlat kött till en industriell nivå. Målet är att producera i 3D vilket skulle ge de resultat man letar efter (Post, 2012). Dock finns det många alternativ som kan erbjuda 3D-tillväxt och det här avsnittet kommer behandla några av dessa alternativ.

Biokemiska signaler

För att signalera till satellitcellerna att kontinuerligt växa och differentiera vid rätt tillfälle krävs rätt signaler. Dessa signaler har tidigare diskuterats och fortsatt forskning på detta område krävs för att få en komplett bild på hur satellitceller regleras i sin nisch. Detta kommer sedan att appliceras i ett medium för ultimata produktion.

Byggnadsställning

För att satellitceller ska kunna växa kräver de en byggnadsställning att fästa på. Tidigare har ECMs betydelse diskuterats och det fungerar även som en byggnadsställning. För att cellerna ska växa optimalt framställs ECM från naturliga material som finns i cellnischen (Engler, 2004). Olika gelsystem har utvecklats som kan bestå av fiber eller en blandning av kollagen och matrigel (proteinmix). Dock är nackdelen att de inte har någon stabilitet. För att få mer stöd har system med syntetiska byggnadsställningar framställts. Dessa byggnadsställningar kan vara uppbyggda av syntetiskt nedbrytbara polymerer och "kollagensvamp" men har än inte varit en större framgång då materialet inte har varit optimalt (Langelaan et al., 2010). För att skapa det optimala materialet måste en balans mellan olika faktorer finnas. Detta innebär vad för form och egenskaper materialet behöver, till exempel hur

hårt/mjuk materialet är. Om cellerna ska utsättas för elektrisk stimulering behöver materialet vara elastiskt. Dessutom är en stor kontaktyta eftertraktat eftersom det ökar diffusionen till fler celler. En annan viktig egenskap är att materialet går att tvätta bort från cellerna och inte följer med i slutprodukten (Datar och Betti, 2010). Vid odling av organ används naturligt ECM med en 3D-struktur vilket har varit framgångsrikt eftersom organ, såsom hjärtat, är ihåligt (Atala och Lanza, 2002). Mediet som användes för att producera Posts hamburgare formades till små stolpar som satellitcellerna kunde organiseras runt och bilda en 3D-struktur i form av enskilda muskelfibrer. Dessa fibrer samlades sedan ihop och blev en hamburgare (Post, 2013).

Näring

Kroppen löser sin näringsutspredning med blodomloppet som även transporterar bort avfallsprodukter. Än finns det ingen som har försökt göra att konstgjort blodomlopp dock för att efterlikna kroppens fysiologiska miljö har olika bioreaktorer utvecklats. I dessa behållare försöker man efterlikna de biologiska betingelser som existerar i en levande organism såsom temperatur, pH, belastning och elektisk stimulering. Enkelt beskrivet placeras cellerna i mitten av en behållare på en typ av byggnadsställning. I behållaren omges cellerna av ett flytande, näringsrikt medel som konstant byts ut. Medlet innehåller dessutom syre och olika biokemiska signaler. Det finns apparater i bioreaktorn som kontrollerar andra fysiologiska faktorer som forskare kan reglera (Liu et al., 2013).

Bioreaktorer erbjuder en plattform för odling av muskler, dock är det många faktorer som ska stämma in vid tillväxt i 3D. Dagens forskning går ut på att få den perfekta kombinationen av alla faktorer som tidigare har diskuterats.

Diskussion

I det här avsnittet diskuteras de faktorer som tidigare har nämnts och hur de kan användas i in vitro köttproduktion samt de hinder som behöver överkommas. Detta för att undersöka in vitro köttproduktions framtidspotential.

Svårigheter

Från Eelns patent, som beskrev rent teoretiskt hur kött kan produceras, till att faktiskt göra en syntetisk hamburgare tog det mindre än 15 år vilket är helt fantastiskt. Det finns däremot stora hinder som måste övervinnas för att uppnå det slutliga målet med denna köttproduktion.

Det som har visat sig att mediet är den viktigaste komponenten för att kunna odla kött i stor skala. Mediet ska innehålla alla faktorer som behövs för att satellitceller ska växa och differentieras i rätt ögonblick. Det sker ny forskning på detta område men tyvärr kommer det ta decennier för att få ett optimalt medium. Problemen är att förståelsen för satellitcellerna inte är i närheten av tillräcklig på grund av komplexiteten hos det regulatoriska systemet. Kristel Boonen tillsammans med Mark Post diskuterar i en artikel att satellitnischen är den rätta vägen att gå för att i framtiden kunna producera kött (Boonen och Post, 2008). Samtidigt som forskning sker på andra stamceller ökar förståelsen snabbt eftersom ökad kunskap inom cellbiologi även ger ledtrådar om hur satellitceller fungerar. I detta arbete har enbart de viktigaste faktorerna tagits upp och kort förklarats. Allt från aktiva gener som Pax7

till dynamisk rörelse är samtliga viktiga komponenter och förståelsen kommer att öka. När förståelsen väl är där och kunskapen om vilka faktorer som krävs måste det dessutom finnas förståelse för hur faktorerna påverkar varandra (se fig 3). Detta kan i teorin enbart testas för att kunna se vilken kombination av faktorer som är mest lämplig och vilka faktorer som bör undvikas. Ett exempel på faktorer som bör undvikas är faktorer som stimulerar apoptos och cellpassivitet såsom TGF-beta. Dock är detta inte det enda problemet in vitro köttproduktionsmediet står inför. Mediet får absolut inte vara miljövänligt, alltså måste alla komponenter gå att återvinna vid en storskalig produktion. Teoretiskt skulle ett medium baserat på växter klara detta kriterium dock finns risken att vissa människor kan vara allergiska mot just den växten. Om mediet är animalbaserat (utvinner komponenter från djur) är det onödigt att föda upp djur för just detta syfte. En utav de större poängen med in vitro köttproduktion är att undvika slakt och vad är syftet med att döda djur för att rädda andra? Möjligheten finns att tillsätta "kontrollceller" som är programmerade att utsöndra de relevanta faktorerna. Dessa celler kan samtidigt vara fettceller som ger mer smak till köttet. Dock i dagsläget, när köttproduktionen än inte har kommit utanför laboratoriet, är detta inte det viktigaste men problemet kommer kvarstå.

Varianter av byggnadsställningar och bioreaktorer har utvecklats och mycket pengar läggs ner på denna forskning. Vävnadsteknik eller "tissue engineering" har blivit ett väletablerat område eftersom det erbjuder, bland annat stamcellsforskning, en plattform att få ihop alla komponenter för att stimulera tillväxt. Även i detta fall krävs vidare forskning för att uppnå framgång.

En annan aspekt är priset, mediet måste vara miljövänligt, fritt från antibiotika, sjukdomar, ge välsmakande produkt och dessutom får det inte vara dyrt. Min åsikt är att detta kommer vara det svåraste problemet. Så fort något ska vara miljövänligt drar priserna iväg och vad är syftet om priset per kg är över 1000 kr? In vitro kött blir i så fall en lyxvara för förmögna och vilket inte är målet. Som det ser ut nu kostar en hamburgare 2,2 miljoner kr, ett pris som måste minska.

Om in vitro kött skulle vara möjligt att sälja storskaligt till ett rimligt pris är frågan om folk skulle vilja köpa det. Det finns en risk att in vitro kött inte känns naturligt och blir främmande. I dagsläget har 1,7 miljoner människor i Europa skrivit under för att stoppa bistånd till stamcellsforskning vilket förmodligen innebär att de inte vill äta syntetiska hamburgare (Brors, 2013).

När syntetiskt kött väl existerar i storskalig produktion kommer fler problem in. Till exempel kvalitétkontroller, sterilitet, kvalitet och födsel av donationsdjur och så vidare. Dessa problem är dock överkomliga och existerar i varje industri.

Framtidsutsikter

Om in vitro kött skulle vara framgångsrikt skulle detta lösa många problem som världen står inför. Ett argument mot in vitro köttproduktion är att det skulle slå ut det nuvarande lantbruket och jobb skulle försvinna. En aspekt som har glömts bort är att detta kan vara ett till alternativ som även kan hjälpa till att mätta kravet på kött. Annars kommer djuren missgynnas och kvalitet försvinna vid en massproduktion som vi inte kan kontrollera. Denna artikels syfte var att undersöka om in vitro kött har en framtid eller inte och med de svårigheter som tidigare har diskuterats går det inte med säkerhet att förutse. Det återstår flera årtionden av forskning för att vara i närheten av

en storskalig produktion. Dock går det inte att bortse att detta fält enbart har existerat under en kort period och redan finns mängder av information. In vitro köttets potential är enorm och det är ett område pengar och tid borde satsas på. Till en början kan syntetiskt kött vara tillgängligt till ett högre pris och enbart för förmögna däremot ska slutresultatet vara för alla. Etiska aspekter går att lösa när IPS-celler är mer accepterat och går att använda. Stamceller är fortfarande något nytt och blir nog mer accepterat i framtiden då det kan lösa mer problem exempelvis inom medicin.

Tack

Ett stort tack till Adam Reger och Alexander Boikov för tänkvärda kommentarer under skrivtiden. Även ska min handledare Martin Svenda ha ett enormt tack för uppmuntran och kloka råd som har underlättat arbetsbördan och höjt arbetet till nästa nivå.

Referenslista

- Aasen T, Raya A, Barrero MJ, Garreta E, Consiglio A, Gonzalez F, Vassena R, Bilić J, Pekarik V, Tiscornia G, Edel M, Boué S, Belmonte JCI. 2008. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nature Biotechnol.* **26**: 1276–1284.
- Albért, T. 2001. Svensk framgång i EU - ny definition på kött. Livsmedelsverket. WWW-dokument 2001-07-19: <http://www.slv.se/sv/Pressmeddelanden/Pressmeddelanden/Svensk-framgang-i-EU---ny-definition-pa-kott/>. Hämtad 2013-11-08.
- Alison M, Islam S. 2009. Attributes of adult stem cells. *J. Pathol.* **217**: 144–160.
- Aoi T, Yae K, Nakagawa M, Ichisaka T, Okita K, Takahashi K, Chiba T, Yamanaka S. 2008. Generation of Pluripotent Stem Cells from Adult Mouse Liver and Stomach Cells. *Science* **321**: 699–702.
- Atala A, Batista PM, Lozier G, Rodriguez SR, Siddiqui MM, Sokar S. 2011. The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid. *Hepatology* **53**: 604-617.
- Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. 1999. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* **284**: 770–776.
- Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. 2001. The Evolving Concept of a Stem Cell: Entity or Function? *Cell* **105**: 829–841.
- Boonen KJ, Post MJ. 2008. The muscle stem cell niche: regulation of satellite cells during regeneration. *Tissue Eng. Part B Rev.* **14**: 419–431.
- Borowski M, Luong MX, Shi M, Stein GS. 2011. *Human Stem Cell Technology and Biology: A Research Guide and Laboratory Manual*. Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ, USA.
- Brors H. 2013. Kontroversiella frågor får starkt stöd i EU. WWW-dokument 2013-11-02: <http://www.dn.se/nyheter/varlden/kontroversiella-fragor-far-starkt-stod-i-eu/>. Hämtad 2013-11-19.
- Brzoska E, Bello V, Darribere T, Moraczewski J. 2006. Integrin alpha3 subunit participates in myoblast adhesion and fusion in vitro. *Differentiation* **74**: 105–118.
- California Institute for Regenerative Medicine. 2013. WWW-dokument 2013-08-09: <http://www.cirm.ca.gov/our-progress/stem-cell-definitions>. Hämtad 2013-11-01.

- Campbell NA, Reece JB, Urry LA, Cain ML, Wasserman SA, Minorsky PV, Jackson RB. 2008. *Biology*. 8:e uppl. Benjamin Cummings, San Francisco.
- Collins CA, Olsen I, Zammit PS, Heslop L, Petrie A, Partridge TA, Morgan JE. 2005. Stem Cell Function, Self-Renewal, and Behavioral Heterogeneity of Cells from the Adult Muscle Satellite Cell Niche. *Cell* **122**: 289–301.
- Conboy IM, Rando TA. 2002. The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis. *Dev. Cell* **3**: 397–409.
- Post M. 2013. Cultured Beef Process. WWW-dokument 2013-08-06: <http://culturedbeef.net/resources/>. Hämtad 2013-11-09.
- Datar I, Betti M. 2010. Possibilities for an in vitro meat production system. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **11**: 13–22.
- Duguid C. 2011. A stem cells story. WWW-dokument 2011-05-09: <http://www.eurostemcell.org/films>. Hämtad 2013-11-01.
- Engler AJ. 2004. Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness: pathological implications for soft or stiff microenvironments. *J. Cell Biol.* **166**: 877–887.
- Evans MJ, Kaufman MH. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**: 154-156.
- Floss T, Arnold HH, Braun T. 1997. A role for FGF-6 in skeletal muscle regeneration. *Genes Dev.* **11**: 2040–2051.
- Furutani Y, Umemoto T, Murakami M, Matsui T, Funaba M. 2011. Role of endogenous TGF- β family in myogenic differentiation of C2C12 cells. *J. Cell. Biochem.* **112**: 614–624.
- Gadue P, Huber TL, Nostro MC, Kattman S, Keller GM. 2005. Germ layer induction from embryonic stem cells. *Exp. Hematol.* **33**: 955–964.
- Gearhart J, Hogan B, Melton D, Pedersen R, Thomas ED, Thomson J, Wilmut SI. 2009. *Essentials of Stem Biology*. 2:a uppl. Elsevier inc. San Francisco.
- Girgenrath M, Kostek CA, Miller JB. 2005. Diseased muscles that lack dystrophin or laminin- α 2 have altered compositions and proliferation of mononuclear cell populations. *BMC Neurol.* **5**: 7.
- Haeckel, EHPA. 2002. *The Evolution of Man*. 10:e uppl. Project Gutenberg, Oxford.
- Hanna J, Saha K, Pando B, van Zon J, Lengner CJ, Creighton MP, van Oudenaarden A, Jaenisch R. 2009. Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature* **462**: 595–601.
- Langelan MLP, Boonen KJM, Polak RB, Baaijens FPT, Post MJ, van der Schaft DWJ. 2010. Meet the new meat: tissue engineered skeletal muscle. *Trends Food Sci. Technol.* **21**: 59–66.
- Li L, Xie T. 2005. Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 605–631.
- Liu M, Liu N, Zang R, Li Y, Yang, ST. 2013. Engineering stem cell niches in bioreactors. *World J. Stem Cells* **5**: 124–135.
- Loh YH, Agarwal S, Park IH, Urbach A, Huo H, Heffner GC, Kim K, Miller JD, Ng K, Daley GQ. 2009. Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood* **113**: 5476–5479.
- Massaous J, Hata A. 1997. TGF- β signalling through the Smad pathway. *Trends Cell Biol.* **7**: 187–192.
- Mauro A. 1961. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **9**: 493–495.

- Nofziger D, Miyamoto A, Lyons KM, Weinmaster G. 1999. Notch signaling imposes two distinct blocks in the differentiation of C2C12 myoblasts. *Development* **126**: 1689–1702.
- Post MJ. 2012. Cultured meat from stem cells: Challenges and prospects. *Meat Sci.* **92**, 297–301.
- Powell-Braxton L, Hollingshead P, Warburton C, Dowd M, Pitts-Meek S, Dalton D, Gillett N, Stewart TA. 1993. IGF-I is required for normal embryonic growth in mice. *Genes Dev.* **7**: 2609–2617.
- Radisic M, Park H, Shing H, Consi T, Schoen FJ, Langer R, Freed LE, Vunjak-Novakovic G. 2004. Functional assembly of engineered myocardium by electrical stimulation of cardiac myocytes cultured on scaffolds. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**: 18129–18134.
- Ratajczak MZ, Majka M, Kucia M, Drukala J, Pietrkowski Z, Peiper S, Janowska-Wieczorek A. 2003. Expression of Functional CXCR4 by Muscle Satellite Cells and Secretion of SDF-1 by Muscle-Derived Fibroblasts is Associated with the Presence of Both Muscle Progenitors in Bone Marrow and Hematopoietic Stem/Progenitor Cells in Muscles. *Stem Cells* **21**: 363–371.
- Rauch BH. 2005. Syndecan-4 Is Required for Thrombin-induced Migration and Proliferation in Human Vascular Smooth Muscle Cells. *J. Biol. Chem.* **208**: 17507–17511.
- Rosen GD, Sanes JR, LaChance R, Cunningham JM, Roman J, Dean DC. 1992. Roles for the integrin VLA-4 and its counter receptor VCAM-1 in myogenesis. *Cell* **69**: 1107–1119.
- Rudnicki MA, Schnegelsberg PN, Stead RH, Braun T, Arnold HH, Jaenisch R. 1993. MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* **75**: 1351–1359.
- Seale P, Rudnicki MA. 2000. A New Look at the Origin, Function, and “Stem-Cell” Status of Muscle Satellite Cells. *Dev. Biol.* **218**: 115–124.
- Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Mansouri A, Gruss P, Rudnicki MA. 2000. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* **102**: 777–786.
- Sköld J. 2012. Inducerade pluripotenta stamceller, en möjlighet för regenerativ medicin i framtiden? Uppsala Universitet, Uppsala.
- Specter, M. 2011. Test-Tube Burgers. *New Yorker*. WWW-dokument 2011-05-23: http://www.newyorker.com/reporting/2011/05/23/110523fa_fact_specter. Hämtad 2013-11-09.
- Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. 2001. Stem cells find their niche. *Nature* **414**: 98–104.
- Steinfeld H, Gerber P, Wassenaar T, Castel V, Rosales M, de Haan C. 2006. Livestock’s long shadow. WWW-dokument 2006. <http://www.fao.org/docrep/010/a0701e/a0701e00.HTM>. Hämtad 2013-11-18.
- Stockdale FE, Topper YJ. 1966. The role of DNA synthesis and mitosis in hormone-dependent differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **56**: 1283–1289.
- Takahashi K, Yamanaka S. 2006. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **126**: 663–676.
- Tatsumi R. 2006. Satellite cell activation in stretched skeletal muscle and the role of nitric oxide and hepatocyte growth factor. *AJP Cell Physiol.* **290**: C1487–C1494.

- Tatsumi R, Anderson JE, Nevoret CJ, Halevy O, Allen, RE. 1998. HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells. Elsevier **194**: 114–128.
- The Cybertry Project. 2010. Signal transduction. WWW-dokument 2010-11-17: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Signal_transduction_pathways.svg. Hämtad 2013-11-16.
- The state of food and agriculture 2009: livestock in the balance. 2009. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rom.
- Till JE, McCulloch EA. 1961. A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells. Radiation Research **14**: 213-222.
- Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabé-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, Miller FD. 2001. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. Nat. Cell Biol. **3**: 778–784.
- Van de Velde H, Cauffman G, Tournaye H, Devroey P, Liebaers I. 2008. The four blastomeres of a 4-cell stage human embryo are able to develop individually into blastocysts with inner cell mass and trophectoderm. Hum. Reprod. **23**: 1742–1747.
- Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. 2001. Stem and Progenitor Cells: Origins, Phenotypes, Lineage Commitments, and Transdifferentiations. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. **17**: 387–403.
- Xiao J. 2003. Regulation of 7 Integrin Expression during Muscle Differentiation. J. Biol. Chem. **278**: 49780–49788.
- Yamasaki K, Hayashi H, Nishiyama K, Kobayashi H, Uto S, Kondo H, Hashimoto S, Fujisato T. 2009. Control of myotube contraction using electrical pulse stimulation for bio-actuator. J. Artif. Organs **12**: 131–137.