

# Decoding cultured meat production

Citation for published version (APA):

Meßmer, T. (2023). *Decoding cultured meat production: The transcriptomic landscape of bovine satellite cells in proliferation and differentiation*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20230421tm>

## Document status and date:

Published: 01/01/2023

## DOI:

[10.26481/dis.20230421tm](https://doi.org/10.26481/dis.20230421tm)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

## SUMMARY

A growing world population and increased per capita consumption have quadrupled the global production of meat since 1960, a trend that is expected to continue for the upcoming decades. Industrial livestock production is required to satisfy this demand but comes at high environmental cost. As a potential solution for this issue, cultured meat technology utilises ex vivo grown stem cells to recreate skeletal muscle tissue for human consumption. The production of cultured meat omits livestock husbandry and slaughter, and is projected to emit less greenhouse gases and require less land and fresh water.

While several proofs of concept have shown its small-scale feasibility, commercialisation of cultured meat faces numerous challenges. Many biological issues are directly related to the cell source, which affects the entire downstream process steps including proliferation and myogenic differentiation. Bovine satellite cells (SCs) are a promising candidate to produce cultured beef. However, protocols to purify, proliferate and differentiate primary SCs traditionally include animal-derived components, which is antithetical to the aim of reducing livestock from the food chain. In addition, SCs experience loss of stemness during long-term in vitro expansion, limiting the maximum quantities that can be produced from a starting sample. In this thesis, we studied SCs in proliferation and differentiation with the help of bioinformatic tools, in particular RNA sequencing, to inform the development of a large-scale, animal component-free cultured meat production process.

Existing transgene-free protocols to induce myogenic differentiation of SCs rely on the reduction of foetal bovine serum concentrations, a process referred to as serum-starvation. In **Chapter 2**, we characterised the transcriptomic and proteomic changes of SCs during serum-starvation. This showed that genes related to cell cycling were downregulated, while the expression of myogenic regulatory factors was increased. In addition, several surface receptors were increasingly expressed during serum-starvation. Supplementation of ligands to those surface receptors enabled myogenic differentiation in the absence of serum, but to a comparable extent and with a similar gene expression profile as through serum-starvation. For the first time, we therefore showed the ability of SCs to perform serum-free and transgene-free myogenic differentiation both on two-dimensional plates and in three-dimensional bioartificial muscles.

Skeletal muscle is a complex tissue containing numerous different cell types, many of which undergoing strong transcriptional changes during muscle regeneration. In **Chapter 3**, we used single-cell RNA sequencing to gain insights into the heterogeneity of bovine muscle tissue and derived cultures that were sorted using canonical SC makers. This identified at least 11 cell types in the bovine skeletal muscle niche with differentially expressed genes. By filtering for surface receptors within those markers, we developed a strategy for fluorescent-activated cell sorting that enabled the simultaneous selection of SCs, fibro-adipogenic progenitors (FAPs), endothelial cells, and smooth muscle mesenchymal cells. Within sorted SC cultures, we noted that a small population of contaminating cell types, in particular FAPs, may be sufficient to overgrow an entire culture under serum-free proliferation conditions. By studying the gene expression of SCs and FAPs, we adjusted the serum-free growth medium to be more selective for SCs, enabling long-term growth with high purity. Finally, we noted three different in vitro states within purified SCs: quiescent, activated, or committed. Transitions between those states happen dynamically within one passage, but occur less frequently upon prolonged culture, indicating that SC ageing manifests in changes of state dynamics.

SCs have a limited proliferation and differentiation capacity in vitro. This necessitates regular sourcing of new cell batches, introducing variability to the bioprocess. In **Chapter 4**, we assessed this variability by studying proliferation and differentiation capacity of cultures derived from 14 donor animals over a prolonged serum-free expansion. We observed three phenotypes: cultures that stopped proliferating between 20-25 PDs, cultures that continued to proliferate but stopped differentiating, and cultures that maintained both proliferation and differentiation capacity beyond 35 PDs. We then analysed in vitro readouts at low PDs, as well as genetic structural variation, DNA methylation and the transcriptional profiles of multiple passages of SCs in order to understand and predict this phenotypic variability.

Finally, in **Chapter 5**, we established a workflow to screen candidate compounds for maintaining SC stemness and to assess their compatibility in a cultured meat production process. We studied the effects of p38 $\alpha$ / $\beta$  inhibitor SB203580 on proliferation and differentiation during a long-term serum-free culture and used RNA sequencing to gain insights into the effect of p38 $\alpha$ / $\beta$ -inhibition on stemness. We found that p38 $\alpha$ / $\beta$ -inhibition increased proliferation speed and prolonged differentiation capacity both on two-dimensional plates and in animal component-free bioartificial muscles. Finally, we tested the application of p38 $\alpha$ / $\beta$  inhibition in

an upscaled bioprocess and observed that its effect is context-dependent, being affected by plate coating and off-target effects of the specific compound.

In conclusion, the detailed study of SC proliferation and differentiation through RNA sequencing enabled considerable improvements to the cultured meat bioprocess. We designed serum-free conditions for high-purity growth and differentiation up to sufficient PDs for an industrial bioprocess, but additional optimisation is needed to achieve this robustly. Bioinformatic tools with single-cell resolution can inform this path leading towards robust, high-performance SC cultures for producing cultured meat.

## SAMENVATTING

Door een groeiende wereldpopulatie en een toenemende consumptie per capita is de productie van vlees verviervoudigd sinds 1960, een trend die zich naar verwachting de komende decennia zal voortzetten. Momenteel voorziet industriële veehouderij deze groeiende vraag met de bijbehorende, nadelige effecten op klimaatverandering. Een potentiële oplossing voor dit probleem is kweekvlees. Deze technologie maakt gebruik van stamcellen om skeletspierweefsel voor humane consumptie te kweken. Middels kweekvleesproductie is veeteelt en het laten slachten hiervan niet meer nodig en dit gaat naar verwachting gepaard met een reductie in broeikasgasuitstoot, en het behoeft minder land en water.

Hoewel verschillende 'proof of concepts' de haalbaarheid op kleine schaal hebben aangetoond, staat de commercialisering van kweekvlees voor tal van uitdagingen. Veel biologische problemen houden direct verband met de cel waarvan wordt uitgegaan. Deze startcel bepaalt verschillende downstream processen waaronder proliferatie en myogene differentiatie. Satellietcellen (spierstamcellen, SCs) zijn een veelbelovende startcel voor kweekvleesproductie. Traditionele protocollen voor het zuiveren, prolifereren en differentiëren van primaire SCs bevatten echter dierlijke componenten, wat in strijd is met het doel om vee uit de voedselketen te verwijderen.

Bovendien vertonen SCs verlies van 'stemness' (verlies van stamcelidentiteit en differentiatiepotentieel) gedurende langdurige in vitro expansie, waardoor de maximale hoeveelheid die uit een startsample geproduceerd kan worden beperkt is. In dit proefschrift hebben we SCs tijdens proliferatie en differentiatie bestudeerd met behulp van bioinformatica-tools, voornamelijk RNA-sequencing, met als doel de ontwikkeling van een grootschalig en dierlijk-vrij kweekvlees productie proces te ondersteunen.

Bestaande transgeen vrije protocollen om myogene differentiatie van SCs te induceren maken gebruik van een methode die ook wel wordt aangeduid als serum-onttrekking ('serum starvation'). Celkweken vereisen normaliter foetaal runder serum in het groeimedium, zodra de concentratie van het serum wordt verlaagd zal differentiatie worden geïnduceerd. In **Hoofdstuk 2** hebben we de veranderingen op eiwit- en genniveau van SCs tijdens serum onttrekking gekarakteriseerd. Hieruit is gebleken dat genen die worden geassocieerd met de celcyclus verminderd tot expressie kwamen, terwijl de expressie van

myogeen regulerende factoren verhoogd was. Bovendien werden verschillende oppervlakte receptoren in toenemende mate tot expressie gebracht tijdens serum onttrekking. Het toevoegen van liganden specifiek voor deze oppervlakte receptoren maakte myogene differentiatie mogelijk in de afwezigheid van serum. De myogene differentiatie was in vergelijkbare mate en met een vergelijkbaar genexpressieprofiel als gezien wordt in serum-starvatie. We hebben hiermee voor het eerst aangetoond dat SCs het vermogen hebben om serumvrij en transgeen-vrij te differentiëren zowel op tweedimensionale kweekplaten als in driedimensionale biologisch kunstmatige spieren.

De skeletspier is een complex weefsel dat talloze verschillende celtypen bevat, waarvan er vele sterke transcriptionele veranderingen ondergaan tijdens spierregeneratie. In **Hoofdstuk 3** hebben we single-cell RNA sequencing gebruikt om inzicht te krijgen in de heterogeniteit van runder spierweefsel en de daaruit geïsoleerde celkweeken welke werden gesorteerd met behulp van klassieke SC markers. Hiermee hebben we tenminste 11 celtypen geïdentificeerd in runder skeletspieren aan de hand van verschillen in gen profielen. We hebben een nieuwe strategie ontwikkeld voor fluorescentie-geactiveerde cell sortering (FACS) door te filteren op oppervlakte receptoren binnen deze markers. Dit maakt het mogelijk om tegelijkertijd te selecteren voor SCs, fibro-adipogene progenitors (FAPs), endotheel cellen en smooth muscle mesenchymal cells. We hebben geconstateerd dat binnen deze gesorteerde SC-kweeken een kleine populatie van ongewilde celtypen, in het bijzonder FAPs, voldoende kan zijn om een volledige celkweek te overwoekeren in serumvrij groeimedium. Door het bestuderen van gen expressie van SCs en FAPs was het mogelijk om ons serumvrije groeimedium aan te passen zodat deze selectiever is voor SCs, waardoor langdurige groei met een hoge zuiverheid mogelijk is. Ten slotte hebben we drie verschillende in vitro cel toestanden vastgesteld binnen een gezuiverde SCs populatie: quiescent (in rust), geactiveerd of toegewijd. Overgangen tussen deze toestanden zijn dynamische en vinden plaats binnen één passage, maar nemen in frequentie af bij een langdurige kweek. Dit duidt erop dat SC veroudering zich manifesteert in veranderingen van deze cel toestanden.

SCs hebben een beperkte proliferatie en differentiatie capaciteit in vitro. Dit zorgt ervoor dat een regelmatige aanvoer van nieuwe cel batches vereist is, wat extra variabiliteit introduceert tijdens het bioproces. In **Hoofdstuk 4** hebben we deze variabiliteit onderzocht door het proliferatie- en differentiatievermogen

te bestuderen van kweken afkomstig van 14 donor runderen gedurende een langdurige serumvrije expansie. We hebben drie fenotypes waargenomen: kweken welke stopte met proliferatie na 20-25 populatie verdubbelingen, kweken welke aanhoudende proliferatie lieten zien maar waarbij de differentiatiecapaciteit verloren ging, en kweken welke zowel proliferatie en differentiatie capaciteit behielden tot tenminste 35 populatie verdubbelingen. Vervolgens zijn verschillende in vitro readouts geanalyseerd bij lage populatie verdubbelingen, evenals genetische structurele variatie, DNA methylatie en transcriptie profielen van verschillende passages van SCs om de fenotypische variabiliteit te begrijpen en te voorspellen.

Ten slotte hebben we in **Hoofdstuk 5** een workflow opgezet om kandidaat compounds te screenen voor het behoud van SC stemness en om de compatibiliteit in een kweek vlees productie proces te testen. We hebben het effect van de p38 $\alpha$ / $\beta$ -remmer SB203580 op proliferatie en differentiatie bestudeerd tijdens een langdurige serumvrije kweek. Tevens hebben we RNA-sequencing gebruikt om inzicht te krijgen in het effect van p38 $\alpha$ / $\beta$ -remming op stemness. We ontdekten dat p38 $\alpha$ / $\beta$ -remming de proliferatiesnelheid en het differentiatievermogen verbeterde zowel op tweedimensionale kweekplaten als in driedimensionale biologisch kunstmatige spieren. Tot slot hebben we de toepassing van p38 $\alpha$ / $\beta$ -remming in een bioproces getest en hierbij is vastgesteld dat het effect contextafhankelijk is en kan worden beïnvloed door plaat coating en off-target effecten van de specifieke compound.

Concluderend, de gedetailleerde studie van SC proliferatie en differentiatie door middel van RNA-sequencing heeft aanzienlijke verbeteringen mogelijk gemaakt in het bioproces van kweekvlees. We hebben serumvrije omstandigheden ontwikkeld voor groei met een hoge zuiverheid en het behoud van differentiatievermogen tot voldoende populatie verdubbelingen behaald zijn voor een industrieel bioproces. Aanvullende optimalisatie is echter nodig om voldoende robuustheid te bereiken in dit proces. Bioinformatica-tools, waarbij wordt gekeken op het niveau van individuele cellen, kunnen bijdragen aan het bereiken van robuuste en hoogwaardige SC kweken voor de productie van kweekvlees.