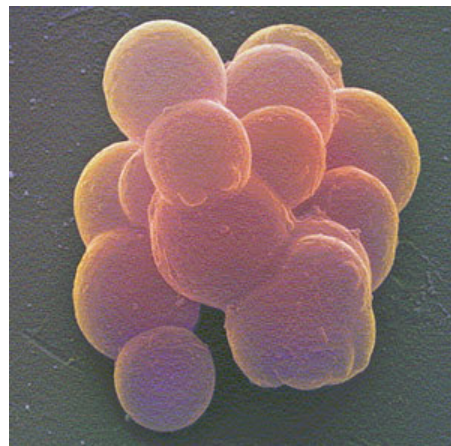




Projectonderwijs MLW -- Blok 2.3 2006/2007

Embryonale vs. volwassen stamcellen



Monique Luijten, i348376

Bram Schmitz, i374490

Jeroen Meekels, i362654

Lennert Coumans, i341169

Auke Otten, i333190

Inhoudsopgave

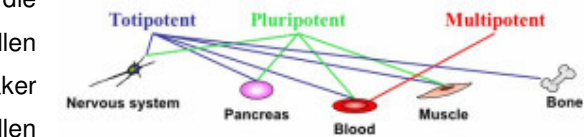
Inhoudsopgave	1
Inleiding: Wat zijn stamcellen?	2
1. Waar haal je stamcellen vandaan?	2
1.1 embryonale stamcellen	2
1.2 volwassen stamcellen	3
2. Het ethische aspect rondom embryonaal onderzoek	4
3. Stamceltherapie bij Cystic Fibrosis	5
3.1 Generatie van longepitheel via volwassen stamcellen	6
3.2 Generatie van longepitheel via embryonale stamcellen	7
4. Conclusie	8
Literatuurlijst	9

Inleiding: Wat zijn stamcellen?

De definitie van een stamcel is een cel die zich deelt en daardoor een dochtercel genereert die zelf een stamcel is en een andere dochtercel die gedifferentieerde cellen produceert [1]. Stamcellen zijn dus een soort oercellen. Ze kunnen veel vaker delen dan normale cellen. Hoe vaak stamcellen kunnen delen hangt af van de lengte van de uiteinden van hun chromosomen, de *telomeren*.

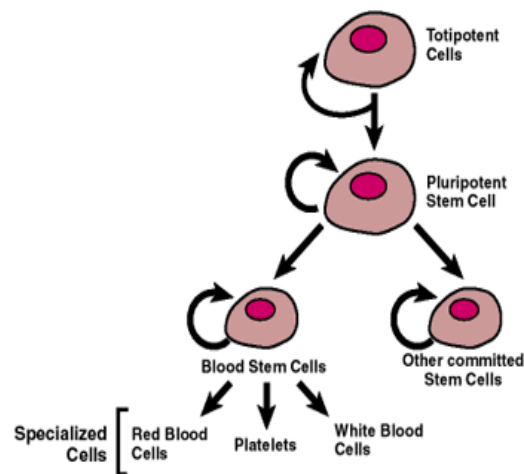
Deze worden gedurende het leven van een normale cel bij elke deling korter. Op een gegeven moment is het telomeer te kort, waardoor *capoptose* (geprogrammeerde celdood) wordt veroorzaakt. Een stamcel heeft echter een enzym (*telomerase*) waardoor de telomeerlengte nagenoeg behouden blijft en de cel zich in theorie oneindig kan delen.

Een aantal dagen na de bevruchting bevat het embryo stamcellen. Deze stamcellen kunnen in een vroeg embryo differentiëren tot alle soorten lichaamsweefsel, in dit stadium worden ze **omnipotente of totipotente stamcellen** genoemd.



Figuur 1 Soorten Stamcellen

In het juiste milieu kunnen deze cellen zich immers ontwikkelen tot een compleet organisme. Ongeveer vier dagen na de bevruchting bereikt de ontwikkeling van het embryo het **blastocyst stadium**. De stamcellen verliezen hun omnipotente eigenschappen, waardoor de **pluripotente stamcellen** gevormd worden. Dit zijn de cellen in het binnenste van de blastocyst. Deze zijn in staat zich te ontwikkelen tot vele, maar niet alle celtypen van de toekomstige foetus. De pluripotente stamcellen gaan zich normaliter in het blastocyst verder specialiseren tot weefsel en organen, ze worden dan **multipotent** genoemd. Deze cellen lijken



Figuur 2 Differentiatie van stamcellen

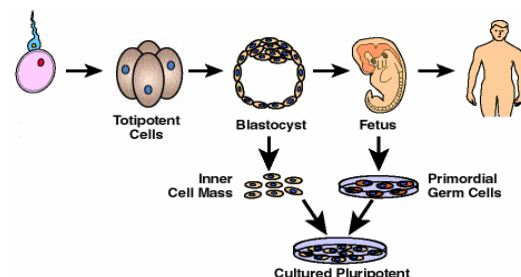
zich niet langer oneindig te kunnen delen, maar hebben nog altijd een grotere capaciteit dan normale cellen. In dit stadium kunnen ze alle celtypen van een specifiek orgaan vormen, maar niet meer van andere organen. Een leverstamcel differentieert louter tot een van de uiteindelijke levercellen.

1. Waar haal je stamcellen vandaan?

Velen ziektes kunnen in potentie worden genezen via behandeling met stamcellen. Stamceltechnologieën kunnen, afhankelijk van het soort behandeling gebruik maken van pluripotente (embryonale) of multipotente (volwassen) stamcellen.

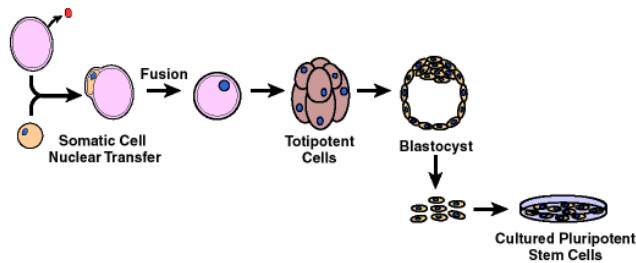
1.1 embryonale stamcellen

Bij stamceltechnologieën welke gericht zijn op het verkrijgen van pluripotente (embryonale) stamcellen is er onderscheid te maken tussen drie bronnen, waaruit



Figuur 3 Generatie van embryonale stamcellen (1)

de stamcel geïsoleerd wordt [2]. De eerste is het onderzoek met embryologische stamcellen. Hierbij worden embryonale cellen geïsoleerd uit blastocysten en hiervan worden cellijnen opgezet. De



Figuur 4 Generatie van embryonale stamcellen (2) De tweede bron is uit foetaal weefsel, ook hiervan wordt een cellijn gekweekt (zie figuur 3). De derde bron is het gebruik van volwassen weefsel, ook wel *somatisch weefsel* genoemd, waaruit de stamcellen zelf gecreëerd worden. Bij de eerste twee bronnen worden de cellen rechtstreeks uit een embryo of foetus gehaald. Bij de derde manier wordt echter een procedure doorlopen waarbij een eicel wordt ontdaan van haar kern met bijbehorend DNA-materiaal. (zie figuur 4). Naast deze lege eicel wordt een somatische cel gezet, hierdoor gaan de twee cellen fuseren en delen (somatische celkerntransplantatie). Op deze manieren kunnen pluripotente cellijnen verkregen worden. Hierbij dient te worden opgemerkt dat vooral de laatste methode, namelijk het kunstmatig opkweken van een embryo om daarna stamcellen te verkrijgen, in Nederland bij wet verboden is.

Er zijn nogal wat ethische kwesties verbonden aan het gebruik van embryonale stamcellen, er zijn namelijk mensen die vinden dat dit het beëindigen van een beginnend leven is. Daarnaast is het moeilijk om deze pluripotente stamcellen goed te kweken, ze differentiëren ongecontroleerd. Verder hebben deze in theorie onsterfelijke cellen neigingen tot tumorvorming.

1.2 volwassen stamcellen

Wanneer er multipotente stamcellen verkregen dienen te worden, kan ook met volwassen weefsel worden gewerkt. Ieder orgaan in het volwassen lichaam bevat stamcellen, hoewel het bij veel organen nog niet mogelijk is deze te determineren en te isoleren, en ook wordt er rekening mee gehouden dat deze misschien bij sommige organen absent zijn. Wanneer dit wel mogelijk is, kunnen deze cellen rechtstreeks uit het weefsel gehaald worden en toegepast waar nodig. Recentelijk is gebleken dat deze wijze van implanteren de multipotente cellen zelfs nog in een andere richting dan hun oorspronkelijke specialisatietype kan sturen, hoewel de resultaten nog beperkt zijn. Feitelijk blijkt dus dat deze multipotente cellen eigenlijk meer pluripotente eigenschappen hebben dan men zou verwachten. Voordelen van volwassen stamcellen zijn de geringe kans op afstotingsreacties en het wegvallen van de genoemde ethische bezwaren. Ook zijn deze stamcellen minder geneigd tot tumorvorming dan de cellen van embryonale afkomst. Een nadeel zou kunnen zijn dat de volwassen stamcellen niet onsterfelijk meer zijn en ook kan het moeilijker zijn ze te verkrijgen in grote aantallen.

Het doel van dit verslag is het vergelijken van behandelmethodes met aan de ene kant embryonale en aan de andere kant volwassen stamcellen. Op dit moment zijn er veel behandelmethodes met volwassen stamcellen, maar biedt de embryonale bron niet veel meer mogelijkheden? Het beschouwen zal worden toegespitst op de erfelijke ziekte Cystic Fibrosis (CF) waarbij studies zijn gedaan naar het gebruik van embryonale stamcellen enerzijds en volwassen stamcellen anderzijds voor generatie van nieuw longepitheel.

2. Het ethische aspect rondom embryonaal onderzoek

Zoals aangegeven biedt stamcelonderzoek veel hoop voor het genezen van ziektes. Het onderzoek staat echter nog in de kinderschoenen en dient gecontinueerd te worden. Het gebruiken en/of kunstmatig aanmaken van embryo's voor het vergaren van stamcellen roept diverse ethische vragen op. De mogelijkheden met embryonale stamcellen lijken onbegrensd. Wel moet worden onderstreept dat dit nog theorie is en kan de vraag gesteld worden of het verantwoord is embryo's te gebruiken. Natuurlijk is er ook wat te zeggen voor het standpunt dat gedegen onderzoek in de loop der tijd wellicht resulteert in grote mogelijkheden, die zonder het gebruik van embryo's misschien niet gerealiseerd kunnen worden. [3]

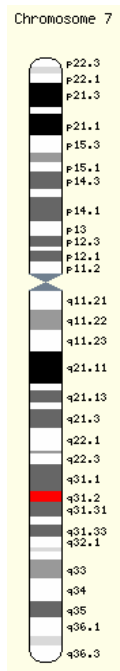
Bij het vergaren van embryonale stamcellen, waarbij de trofoblast doorbroken moet worden om bij het binnenste gedeelte van de blastocyst te komen, zal het embryo afsterven. Hoewel een deel van de bevolking dit als ethisch verantwoord ziet, omdat er een hoger doel mee wordt bereikt, zal lang niet iedereen het hier mee eens zijn. Dit omdat er een potentieel menselijk leven wordt beëindigd voor wetenschappelijk onderzoek. Embryonale stamcellen worden tijdens het vroegste stadium van het embryo geoogst, 4 à 5 dagen na bevruchting kunnen deze pluripotente stamcellen uit het blastocyst gehaald worden. Kan dit dan al een leven genoemd worden? Of gaat het hier louter om een klompje cellen?

Volgens de huidige Nederlandse wetgeving wordt een klompje cellen dat kan uitgroeien tot een mens een embryo genoemd. Dit embryo valt dan ook onder de wettelijke bescherming en mag niet worden gebruikt voor wetenschappelijk onderzoek. Niet-levensvatbare IVF-embryo's, ook wel restembryo's genoemd, mogen daarentegen wel gebruikt worden voor onderzoek. Het therapeutisch kloneren van embryo's voor onderzoek is strikt verboden. België en het Verenigd Koninkrijk zijn de enige landen in Europa waar dit wel is toegestaan. Het verschil in beleid tussen de Europese landen is volledig toe te schrijven aan hoe een embryo wordt gedefinieerd.

Tot op heden wordt er meer onderzoek verricht naar volwassen stamcellen, logischerwijs is de voortgang op dit gebied ook groter. Het zoeken naar alternatieven zoals stamcellen uit navelstrengbloed, abortusembrryo's en vruchtwater wordt sterker gestimuleerd dan embryonaal onderzoek. Recent onderzoek heeft uitgewezen dat het differentiatievermogen van volwassen stamcellen embryonale stamcellen kunnen evenaren. Dit zou betekenen dat een vorm van stamcelonderzoek in beeld komt die veel minder controversieel is dan embryonaal onderzoek. Blijkt hier dan definitief uit dat embryonale stamcellen langzaamaan hun unieke, onbegrensde mogelijkheden om ziektes te genezen verliezen aan de volwassen stemcellen, die lang niet tot dergelijke mogelijkheden in staat leken te zijn?

3. Stamceltherapie bij Cystic Fibrosis

Cystic Fibrosis (CF) is een recessieve aandoening. Mensen met tweemaal het recessieve allel dat codeert voor het foutieve eiwit dat leidt tot deze ziekte zullen symptomen van de ziekte ontwikkelen. CF is nog altijd niet volledig te genezen. Een van de meest voorkomende symptomen is problemen met ademhaling en longinfecties. Ook andere lichaamsdelen kunnen echter worden aangetast. CF is een van de meest ernstige erfelijke ziektes in de wereld. De laatste jaren is de levensverwachting van de mensen met CF wel behoorlijk gestegen. De ziekte komt het meest voor in Europa, voornamelijk bij Joden. Een op de dertig mensen in Europa is drager van het gen dat leidt tot CF. In de wereld zijn er ongeveer 50.000 mensen die lijden aan CF, waarvan 20.000 in Europa en 1.200 in Nederland. Dit houdt in dat in Nederland dus een half miljoen mensen drager zijn van dit gen. Dat is dus 1 op de 30 mensen.

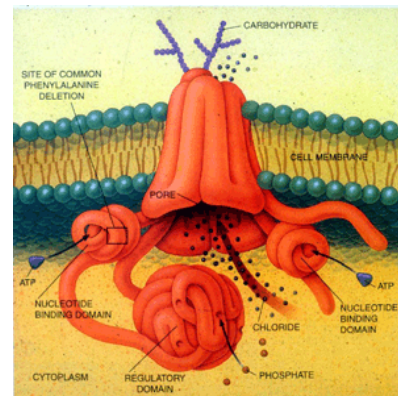


Figuur 5

Het betrokken gen dat leidt tot CF heet het *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gen* (CFTR-gen). Een mutatie in dit gen kan leiden tot CF. Het CFTR-gen ligt op locus q31.2 van chromosoom 7 (zie figuur 5). Dit is 180.000 basenparen lang en codeert voor een eiwit van ongeveer 1.480 aminozuren. Er zijn verschillende mutaties bekend binnen het CFTR-gen. De mutatie $\Delta F508$ zorgt in 70% van de gevallen voor de ontwikkeling van de ziekte. $\Delta F508$ is een deletie van drie nucleotiden in het gen, hierdoor wordt het aminozuur fenylalanine (F) niet ingebouwd op de 508^e positie van het eiwit. Hierdoor onderdaat het eiwit een conformatieverandering en werkt niet meer adequaat.

Het eiwit geproduceerd door het gezonde CFTR-gen is een chloridekanaal (zie figuur 6). Een mutatie van het gen zorgt voor een foutief chloridekanaal. Dit wijzigt het vervoer van chloride en vloeistof. Dit is slecht voor het longdefensiesysteem. Vaak bezwijken patiënten met CF aan ook aan chronische bacteriële infecties en longfalen.

Herstel van abnormale CFTR-functie aan luchtwegepitheel bij patiënten met CF is een potentiële geneeswijze voor de ziekte. [4] Dit kan door volwassen stamcellen uit beenmerg te laten differentiëren tot luchtwegepitheel [5]. Ook embryonale stamcellen (ES) blijken in staat te differentiëren tot Clara cellen (longcellen). [6] en [7]. Wanneer ES worden gecultiveerd op de interface lucht-vloeistof ontstaan volledig gedifferentieerde luchtwegepitheelcellen. Ontdekt is dat het gegenereerde epitheel de eigenschappen bevat van "normaal" luchtwegepitheel. In dit hoofdstuk beschouwen we de beide manieren van luchtwegepitheel generatie om zo een antwoord te vinden op de vraag welke stamcelsoort nu de beste lijkt.

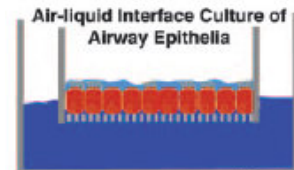


Figuur 6 CFTR eiwit

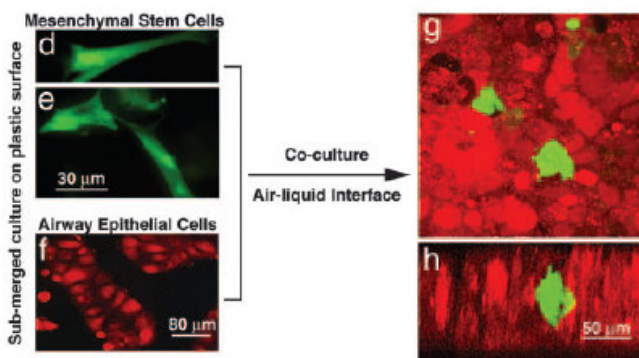
3.1 Generatie van longepitheel via volwassen stamcellen

In een onderzoek van Wang uit 2004 [5] worden mesenchymale stamcellen uit het beenmerg (MSC's) gebruikt om luchtwegepitheel te maken. Deze MSC's hebben een defect in het CFTR-gen, omdat ze uit CF-patiënten worden gehaald. Om tot "niet zieke" cellen te ontwikkelen, moeten de "zieke" MSC's eerst een gencorrectie ondergaan. Dit wordt gedaan door een virale vector in te brengen die het juiste gen bevat. Nagegaan wordt of deze gencorrectie van MSC's juist werken en of deze correctie zorgt voor een verbetering van de defecte Cl⁻ secretie in patiënten met CF.

De MSC's die gecorrigeerd waren voor de genmutatie werden samen met luchtwegepitheelcellen van dezelfde patiënten in cultuur gebracht. Dit gebeurt in een lucht-vloeistof interface die gelijk is aan omstandigheden zoals in de longen. (Zie figuur 7). Om te kijken of dit succes heeft gehad worden de celculturen op meerdere facetten gecontroleerd. Allereerst



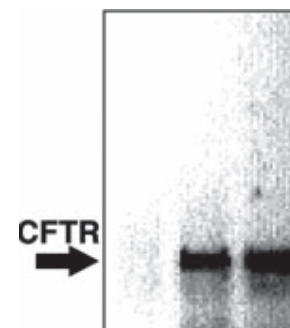
Figuur 7 Air-liquid interface



Figuur 8 Microscopische kleuring longepitheel

De mesenchymale stamcellen, die er eerst uitzien als een fibroblast of een platte-polygonale cel, zien er in de co-cultuur uit als epitheelachtige kubisch- of kolomvormige cellen (zie figuur 8). Dit impliceert dat de MSC's een conformatieverandering zijn ondergaan en zich specialiseren in epitheelcellen. Om te controleren of ze zich richting luchtwegepitheelcellen vormen, wordt gekeken of de MSC's epitheelspecifieke markergenen tot expressie brengen. Een van deze markergenen is CK-18. Hieruit bleek dat sommige MSC's zich tot volwassen luchtwegepitheelcellen gedifferentieerd hadden. Dit bevestigt de hypothese dat de MSC's zich tot epitheelcellen hebben ontwikkeld. Hetzelfde geldt voor ocludine, een tight junction eiwit. Om te controleren of de gedifferentieerde MSC's het CFTR-gen nu wel tot expressie brengen wordt een PCR uitgevoerd. Hiervoor worden een tweetal primers gebruikt waarvan er één specifiek aangrijpt op het stukje mRNA dat bij de $\Delta F508$ -deletie bij CF patiënten afwezig is. Alleen bij gezond mRNA ontstaat er een 330 bp lang stuk DNA dat kan worden gedetecteerd. Bij een cocultuur van CF-geïnfecteerde epitheel cellen en gezonde MSC's wordt dit 330 bp lang stukje mRNA wel gedetecteerd (zie figuur 9). Hieruit blijkt dat deze cellen het juiste gen bevatten en dus mogelijk een behandelmethode zijn voor CF. Hierdoor wordt wellicht het juiste CFTR-chloridekanaal ingebouwd, waardoor infecties en longfalen door slijmvorming kunnen worden voorkomen.

Er zijn wel kanttekeningen. De cellen moeten toegankelijk zijn voor gencorrectie en na deze aanpassing moeten ze zich nog kunnen differentiëren richting longweefsel. Ze moeten dus pluripotent blijven.



Figuur 9 PCR

3.2 Generatie van longepitheel via embryonale stamcellen

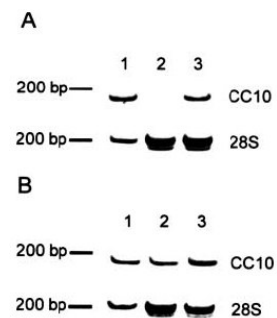
In onderzoek van Coraux uit 2004 [6] wordt eveneens luchtwegeepitheel gegenereerd uit stamcellen. In dit onderzoek worden echter embryonale stamcellen (ES) gebruikt. In dit onderzoek betreft het echter wel een procedure waar muizenembryo's gebruikt worden. Volgens een onderzoek van Samadikuchaksareai et al. uit 2006 [7] kan een soortgelijke procedure gevolgd worden voor de generatie van longepitheel uit humane embryonale stamcellen.

Coraux gebruikt, zoals altijd bij embryonale stamcellen, de binnenmassa van blastocysten voor de generatie van een stamcellijn. Om te voorkomen dat deze cellen zelf differentiëren wordt *leukemia inhibitory factor* (LIF) toegevoegd. De nog ongedifferentieerde cellen uit de cellijn kunnen namelijk spontaan differentiëren naar alle derivaten van de drie lagen van het embryo (ectoderm, endoderm of mesoderm). Dit gebeurt door de vorming van embryonale lichaampjes (EL). In dit onderzoek wordt getracht ES cellen te laten differentiëren tot alle specifieke longepitheelcellen door de werking van specifieke matrix componenten en/of groeifactoren. Een van deze cellen is de Clara-cel, de meest karakteristieke longepitheelcel. Deze cellen produceren de eiwitten CC10 (Clara cell 10 KD proteïne) en SP (surfactant proteïnes), zoals SP-B en SP-D. Door na te gaan of deze eiwitten tot expressie komen kan worden vastgesteld dat ES cellen (uit de muis) zijn gedifferentieerd tot Clara cellen, specifiek voor longepitheel.

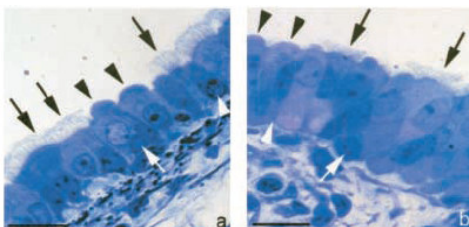
Het onderzoek toont aan dat ES cellen op dag 15 spontaan EL vormen. Deze embryonale lichaampjes kunnen Clara cellen vormen. Dit blijkt uit het feit dat wanneer ES cellen worden gecultiveerd zonder verdere toevoegingen vanaf dag 15 mRNA wordt gevonden van het eiwit CC10. Dit werd niet gevonden in ongedifferentieerde ES cellen. Er werd toen gezocht naar factoren die de ES cellen tot Clara cellen konden laten differentiëren

zonder de vorming van EL. Via PCR (met gebruik van specifieke primers voor de Clara eiwitten) werd gevonden dat bij toevoeging van type I collageen (een matrixeiwit) aan de stamcelcultuur op dag 8 al CC10 mRNA gevonden werd. In figuur 10 is dit weergegeven. In laan 1 zit als controle luchtwegeepitheel van gezonde muizen, in laan 2 zitten ES cellen gecultiveerd op plastic en in laan 3 zitten ES cellen gecultiveerd op type I collageen. In figuur 10A is de situatie weergegeven na 8 dagen. Hieruit blijkt dat CC10 mRNA alleen aanwezig is bij het controle luchtwegeepitheel en bij de ES cellen gecultiveerd op type I collageen. Na 15 dagen (figuur 10B) is dit ook het geval bij ES cellen gecultiveerd op plastic, door de spontane vorming van EL. Het 28S is een huishoudgen, een gen dat in alle cellen aanwezig is en een 212 bp transcript levert en dient als controle.

De cellen gecultiveerd op type I collageen worden na 8 dagen verzameld en nog een week gecultiveerd op type I collageen om vervolgens te differentiëren in de lucht-vloeistof interface. Figuur 11 toont aan dat de cellen verkregen via deze procedure (figuur 11a) vrijwel dezelfde zijn als die van normaal gezond longepitheelweefsel (figuur 11b). Om dit alles



Figuur 10 PCR bij 8 (A) en 15 (B) dagen



Figuur 11 Morfologische vergelijking epitheelcellen

kracht bij te zetten werd ook gekeken naar de expressie van de eerder genoemde specifieke eiwitten. Hieruit blijkt dat de specifieke eiwitten CC10 en SP-D aanwezig zijn in het longepitheel verkregen uit ES cellen op type I collageen. Verder blijkt uit de specifieke kleuring van ciliated cells met β -tubuline dat epitheelcellen verkregen via spontane differentiatie van ES cellen via EL geen ciliated cells bevatten, terwijl ES gecultiveerd op type I collageen deze ciliated cells wel bevatten. Ook de lucht-vloeistof interface blijkt hiervoor een vereiste.

Hoewel in dit onderzoek niet specifiek gezocht is naar de expressie van het CFTR-eiwit, is het wel aannemelijk dat wanneer er longepitheel ontstaat uit de ES cellen via de beschreven procedure, deze cellen ook in staat zijn het juiste CFTR-eiwit tot expressie te brengen. Op deze manier kan wellicht ook het gebruik van embryonale stamcellen leiden tot een genezing van CF.

4. Conclusie

Kijkende naar beide onderzoeken, welke hierboven beschreven staan, kan de conclusie getrokken worden dat uit zowel embryonale als somatische (uit het beenmerg) stamcellen luchtwegepitheelcellen gevormd kunnen worden. Welke methode de beste is valt moeilijk te zeggen, aangezien het embryologische onderzoek minder gevorderd is. Door de vele ethische bezwaren wordt het onderzoek naar embryologische stamcellen behoorlijk gedwarsboemd. Verder wordt embryonaal onderzoek vaak ook gestaakt als een vergelijkbaar volwassen stamcelonderzoek resultaat heeft opgeleverd, dit komt omdat het dan niet nodig is tegen de ethische bezwaren in te gaan.

Bij somatische stamcellen wordt de stamcel uit het beenmerg van de patiënt gehaald, waardoor er geen kans op immunologische afstotingsreacties is, en wordt het gezonde CFTR-gen ingebouwd. Met embryonale stamcellen hoeft deze procedure niet te worden doorlopen en wordt meteen gezond weefsel verkregen, hoewel het risico op afstoting dan wel groter is. Op dit moment lijkt het echter de beste oplossing te werken met somatische stamcellen, maar dit is volledig gebaseerd op de ethische kwestie en niet op het succes van de behandeling.

Persoonlijk vinden wij het gebruik van embryonale stamcellen helemaal niet verwerpelijk. We vinden het zelfs zonde dat embryonaal stamcelonderzoek niet de kans krijgt om zijn grote potentie in genezing te bewijzen. Tegenstanders van embryonaal stamcelonderzoek nemen het standpunt in dat het gebruik van embryonale stamcellen een moord is op potentieel leven. Wij hebben het idee dat door het belemmeren van embryonaal onderzoek mensen die wellicht genezen hadden kunnen worden nu geen adequate behandeling kunnen ontvangen en wellicht komen te overlijden. Dit is ook het geval bij mensen met CF.

De huidige tendens (in Nederland) is dat embryonaal stamcelonderzoek het verliest van volwassen stamcelonderzoek. De vraag is echter of dit een goede tendens is, nu blijkt dat embryonaal stamcelonderzoek niet de kans krijgt zich adequaat te ontplooien. Feit blijkt echter wel dat volwassen stamcelonderzoek veel resultaat heeft opgeleverd. Het is derhalve logisch dat op dit moment volwassen stamceltherapieën een straatlengte voorliggen op de embryonale stamceltherapieën en het is maar de vraag of de embryonale stamcellen de kans krijgen om deze verloren strijd ooit nog in te halen.

Literatuurlijst

1. Prockop DJ. Embryonic Stem Cells Versus Adults Stem Cells: Some Seemingly Simple Questions, Elsevier
2. Website Stichting voorlichting stamcellen:
<http://www.stamcel.org/html/stamcellen2.htm>
3. Website Centrum voor Biomedische Ethiek en Recht - volwassen stamcellen steeds meer alternatief voor voor embryonale stamcellen:
<http://www.kuleuven.ac.be/cbmer/page.php?LAN=N&FILE=subject&ID=261&PAGE=1>
4. Spencer H, Jaffe A et al. The potential for stem cell therapy in cystic fibrosis, J R Soc Med 2004;97(Suppl. 44):52-56
5. Wang G, Bunell, BA, et al. Adult stem cells from bone marrow stroma differentiate into airway epithelia cells: Potential therapy for cystic fibrosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Jan 4;102(1):186-91.
6. Coraux C, Nawrocki-Raby B, et al. Embryonic Stem Cells Generate Airway Epithelial Tissue, Am J Respir Cell Mol Biol. 2005 Feb;32(2):87-92. Epub 2004 Dec 2.
7. Samadikuchaksaraei A, Cohen D, et al. Derivation of Distal Airway Epithelium from Human Embryonic Stem Cells, Tissue Eng. 2006 Apr;12(4):867-75.