

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA IN CHIMICA INDUSTRIALE

**Polimerizzazione Radicalica a Trasferimento Atomico Catalizzata da
Proteine**

Relatore: Edmondo Maria Benetti

Laureando: Massimiliano Apolloni

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

Indice

INTRODUZIONE.....	2
POLIMERIZZAZIONE RADICALICA A TRASFERIMENTO ATOMICO (ATRP).....	3
Meccanismo di reazione.....	4
Cinetica di reazione.....	5
POLIMERIZZAZIONE RADICALICA A TRASFERIMENTO ATOMICO CATALIZZATA DA PROTEINE (bio-ATRP)	6
Polimerizzazione dell’N-vinilimidazolo mediante laccasi	7
Condizioni di reazione	8
Confronto tra bioATRP condotte in soluzione e bioATRP condotte in superficie (SI-bioATRP) ...	9
APPLICAZIONI	11
Sintesi di cellule artificiali mediante (polymerization induced self assembly (PISA))	11
Sintesi di GUVs via bioATRP.....	11
ATRP come metodo quantitativo per la determinazione dell’emoglobina nei fluidi biologici.....	14
Funzionalizzazione di cellule tramite bio-ATRP per modificarne le proprietà.....	17
Rivestimento delle cellule di lievito con strati polimerici	18
Funzionalizzazione delle superfici.....	20
CONCLUSIONI.....	21
BIBLIOGRAFIA	22

INTRODUZIONE

La polimerizzazione radicalica a trasferimento atomico (ATRP) è tra le tecniche di polimerizzazione controllate, una delle più utilizzate. Rispetto alla polimerizzazione radicalica libera (FRP) permette un maggior controllo sulla reazione, confermato dall'aumento lineare del peso molecolare con la conversione, carattere comune a tutte le polimerizzazioni "viventi", non solo radicaliche. Questo tipo di polimerizzazione necessita, oltre ad un iniziatore, di un catalizzatore. Comunemente si utilizzano complessi di metalli di transizione, tuttavia negli ultimi anni la ricerca scientifica ha richiamato l'attenzione verso certe classi di proteine, le quali avendo coordinato un metallo sulla loro superficie possono agire in maniera analoga, essendo dunque buoni candidati per la catalisi dei processi ATRP.

In questo elaborato verrà esposto un quadro generale dello stato attuale dell'arte e verranno evidenziate le principali differenze tra ATRP tradizionale e ATRP catalizzata da proteine, che analogamente a quanto riportato nei vari articoli scientifici d'ora in poi chiameremo bioATRP. Verranno anche esposte le principali applicazioni fino ad ora approfondite, traendo delle conclusioni basate su evidenze empiriche riportate in letteratura scientifica. Per l'appunto va sottolineato che non è stato svolto alcun lavoro di ricerca sperimentale, l'elaborato è stato scritto in sola funzione di una ricerca bibliografica.

POLIMERIZZAZIONE RADICALICA A TRASFERIMENTO ATOMICO (ATRP)

La polimerizzazione radicalica a trasferimento atomico si colloca tra la classe di polimerizzazioni dette “living polymerizations”, termine, che oltre ad indicare il carattere controllato della reazione stessa, si riferisce a un meccanismo di polimerizzazione ben specifico. I criteri generali che devono essere soddisfatti per questo tipo di polimerizzazioni sono i seguenti:

1. La velocità di iniziazione v_i deve essere molto maggiore di quella di propagazione v_p

$$v_i \gg v_p \quad (1.1)$$

Questo garantisce che le catene inizino a propagare più o meno nello stesso istante e quindi si ottiene maggior controllo della reazione.

2. È necessario il controllo dei gruppi terminali
3. Non devono essere presenti reazioni di trasferimento e/o terminazione irreversibile
4. Reattività uniforme dei monomeri
5. Il grado di polimerizzazione P_n deve essere direttamente e linearmente proporzionale alla conversione p , secondo la seguente espressione

$$P_n = \frac{[M]_0}{[I]_0} * p \quad (1.2)$$

$[M]_0$ e $[I]_0$ sono concentrazione di monomero iniziale e concentrazione di iniziatore iniziale rispettivamente.

Per controllo dei gruppi terminali ci si riferisce al continuo equilibrio, che si instaura durante la fase di propagazione, tra il radicale attivo (radicale transiente) che propaga e la sua forma inattiva, detta anche radicale dormiente. Va specificato che nelle living polymerizations, il radicale transiente è presente in minor quantità rispetto a quello dormiente. Sarà proprio questo a garantire il carattere controllato della reazione. Tale comportamento è verificabile, come già anticipato, seguendo l'andamento della massa molecolare media numerica M_0 o il grado di polimerizzazione in funzione della conversione, come riportato in *figura 1*.

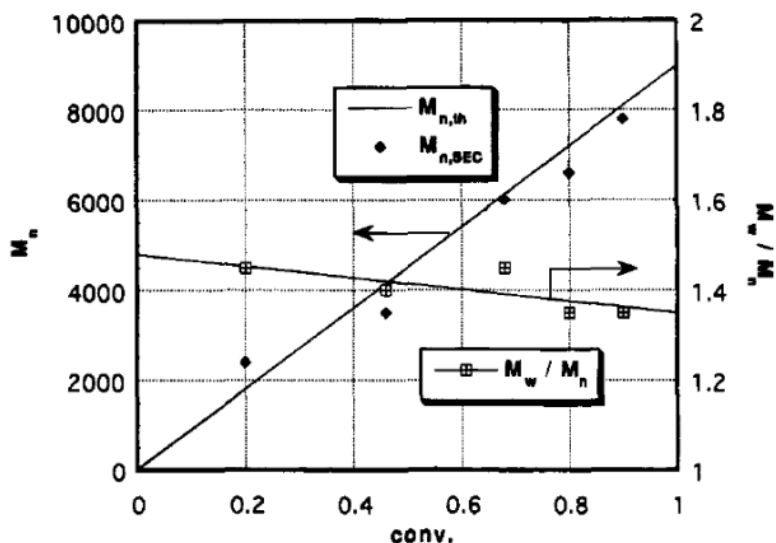
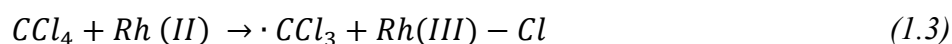


Figura 1. Plot Massa Molecolare Media Numerica M_n vs conversione per la polimerizzazione ATRP dello stirene

Nella figura sopra raffigurata si può notare un esempio di polimerizzazione controllata: la pendenza è circa unitaria e l'andamento è lineare. Nel grafico poi, viene anche indicato il rapporto M_w/M_n (M_w è la massa molecolare media ponderale) in funzione della conversione; si noti che questo è circa costante. Tale rapporto è indicativo della polidispersità (PDI) e il fatto che questo valga circa uno è una conferma ulteriore del carattere controllato.

Meccanismo di reazione

Per quanto riguarda invece lo svolgersi della reazione in sé, questa come tutte le reazioni di polimerizzazione è schematizzabile in iniziazione, propagazione e terminazione. L'iniziazione avviene per merito di un iniziatore che, in presenza di un catalizzatore opportuno, genera un radicale che poi sarà trasferito al monomero. Considerando come esempio la reazione di polimerizzazione del metil-metacrilato, usando come catalizzatore un complesso a base di rodio e CCl_4 come iniziatore, possiamo così riassumere gli steps principali:



La reazione riportata nell'espressione 1.3 vede l'aggiunta di un legante alogenuro al centro metallico e la simultanea formazione di un radicale sull'iniziatore. Si ha una scissione omolitica del legame C-Cl. Successivamente il radicale formatosi può reagire con il monomero seguendo la reazione di propagazione (vedi figura 2).

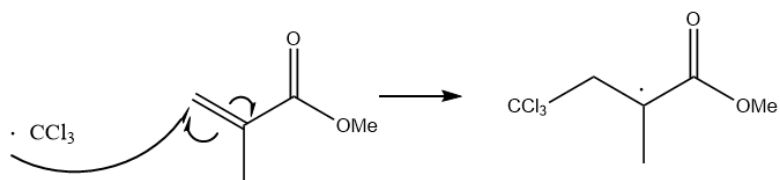


Figura 2. Formazione radicale sul monomero

A questo punto, si instaura il precedentemente citato equilibrio tra radicale transiente e radicale dormiente: il catalizzatore nella sua forma disattivante dona un atomo di cloro per “smorzare” il radicale presente sulla catena appena formatasi (vedi figura 3). L’equilibrio è spostato verso il radicale dormiente.

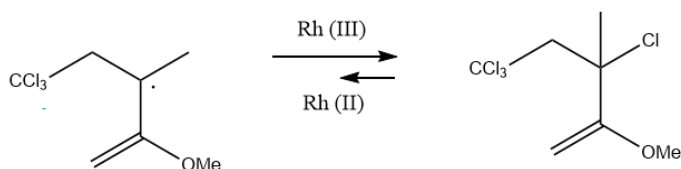


Figura 3. Equilibrio radicale transiente-radical dormiente

Infine si avrà la fase di propagazione a carico del radicale transiente, e solo una volta terminata la concentrazione stechiometrica di monomero iniziale, la reazione terminerà. Si può anche avere una terminazione volontaria aggiungendo agenti che inattivino il catalizzatore.

Cinetica di reazione

Se consideriamo schematicamente l’equilibrio ATRP come segue:

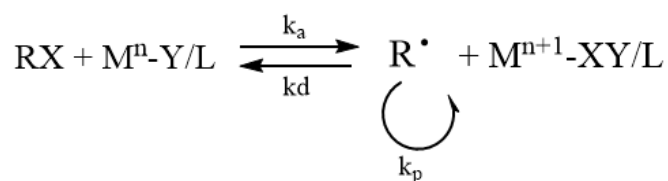


Figura 4. Schema di equilibrio radicale transiente (R^\bullet) -radical dormiente (RX). $M^n\text{-XY}$ è il catalizzatore mentre L è un ligante qualsiasi, ad esempio bipyridina.

E definiamo la velocità di reazione secondo la velocità di scomparsa del monomero (equazione 1.4)

$$v = -\frac{d[M]}{dt} = k_p[R^\bullet][M] \quad (1.4)$$

$$K_{eq} = \frac{k_a}{k_d} = \frac{[R\cdot] [M^{n+1} - XY/L]}{[RX][M^n X/L]} \quad (1.5)$$

Allora possiamo scrivere la stessa velocità in funzione delle concentrazioni di attivatore e deattivatore (equazione 1.6) derivandole dall'espressione 1.5, riferita alla costante di equilibrio.

$$v = k_p [R\cdot][M] = k_p K_{eq} [RX] \frac{[M^n X/L]}{[M^{n+1} XY/L]} [M] \quad (1.6)$$

Si conclude quindi che la velocità di reazione è direttamente proporzionale alla concentrazione di attivatore (complesso metallico nella sua forma ridotta) e, inversamente proporzionale alla concentrazione di deattivatore (complesso metallico nello stato di ossidazione più alto).

POLIMERIZZAZIONE RADICALICA A TRASFERIMENTO ATOMICO CATALIZZATA DA PROTEINE (bio-ATRP)

Come è già stato introdotto, la presenza di un catalizzatore, in questo tipo di polimerizzazioni, oltre ad essere importante è condizione necessaria. I catalizzatori possono essere composti organometallici quali complessi di metalli di transizione, ma possono anche essere composti bio-inorganici come proteine. Certi enzimi in particolare hanno la caratteristica di aver coordinato uno o più atomi metallici all'interno della propria struttura. Per citarne alcuni abbiamo emoglobina (Hb), l'enzima perossidasi presente nella radice di rafano (HRP), l'enzima ossigenasi del glucosio (GO_x), clorofilla, catalasi, laccasi ecc. Spesso l'atomo metallico si trova coordinato al gruppo eme, una struttura presente in alcuni enzimi composta da un anello porfirinico. In ogni caso, la funzione svolta da tali enzimi è analoga a quella svolta dai complessi metallici, senonché i primi godono di diversi vantaggi. Tra i principali si ricorda il costo minore, la disponibilità maggiore, il carattere "green" ^[1], la possibilità di impiego dei polimeri ottenuti in applicazioni biomediche, in quanto gli enzimi sono molecole biocompatibili. Rispetto ai catalizzatori tradizionali, il metallo è fortemente legato alla proteina e questo fa sì che il prodotto sarà meno inquinato di elementi inorganici.^[2] Un ulteriore vantaggio è la separazione facilitata dell'enzima dal prodotto una volta terminata la reazione.

Per quanto riguarda il meccanismo di catalisi è lo stesso delle ATRP tradizionali, va sottolineato però che spesso viene impiegato un agente riducente, ad esempio ascorbato di sodio, atto a ridurre il catalizzatore (vedi *figura 5*) quando si trova nella sua forma ossidata (non attiva) per permettere una migliore efficienza di reazione.

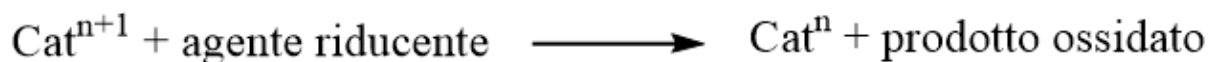


Figura 5. Funzione agente riducente

Si noti che questa reazione redox (vedi figura 5) non agisce direttamente sull'equilibrio radicale transiente – radicale dormiente, ma la rigenerazione del catalizzatore può darne un effetto indiretto. Un aumento della concentrazione di catalizzatore ridotto (forma attiva) sposta l'equilibrio verso il radicale transiente. Allo stesso modo un aumento di concentrazione del catalizzatore ridotto favorisce l'iniziazione.

È possibile classificare le proteine con attività catalitica, in quattro classi in base alle funzioni svolte:

1. Iniziazione (es. HRP)
2. Fotocatalisi (es. clorofilla, GO_x)
3. Deossigenazione (es. GO_x)
4. ATRPase (laccasi, catalasi, Hb, mioglobina)

Il caso della laccasi è singolare in termini di vantaggi, poiché è possibile portare a termine una reazione che mediante catalizzatori tradizionali invece non funzionerebbe, ovvero la polimerizzazione del N-vinilimidazolo.

Polimerizzazione dell'N-vinilimidazolo mediante laccasi

I derivati dell'eterociclo imidazolo sono di fondamentale importanza poiché questo è un elemento strutturale dell'amminoacido istidina e dell'ormone istamina. La polimerizzazione dell'N-vinilimidazolo infatti si rende utile per il “drug-delivery” oltre che per rivestimenti anti-corrosione. I metodi classici di polimerizzazione controllata (CRP), tra cui ATRP, non danno buoni risultati ^[3] in quanto il radicale transiente non è stabilizzato per risonanza, a differenza di quanto accade per gli isomeri dell'N-vinilimidazolo. Questa mancanza di stabilità porta inoltre a trasferimento di carica e terminazione. In aggiunta, sia i monomeri, che i polimeri che si andrebbero a formare, complessano i centri metallici di catalizzatori tradizionali ^{[3][4] [5]}. La formazione di questi legami stabili è un problema anche in termini di separazione catalizzatore-prodotto. Per evitare tali problematiche si è scelto di usare la laccasi, enzima ricavato dal fungo *Trametes Versicolor*, il quale instaura un legame molto forte con gli atomi di rame ad esso coordinati e quindi evita gli inconvenienti appena descritti.^[6] La laccasi è un enzima appartenente alla classe ossidoreduttasi, avente più di un atomo di rame coordinato. Il primo atomo, detto di tipo 1, è posizionato sulla superficie della proteina, mentre altri tre (tipo 2 e tipo 3) sono organizzati in un cluster, presente sulla proteina e dove avviene la riduzione dell'ossigeno molecolare.^[7]

Per la polimerizzazione dell’N-vinilimidazolo la laccasi è l’unico enzima che ha dato delle risposte sperimentali positive. Più nel dettaglio la conversione è del 70% in 24 ore ^[8]. La cinetica studiata è del primo ordine e la conversione aumenta linearmente con la massa molecolare (conferma del carattere controllato della reazione). Tuttavia, si è notato che la dispersione aumenta durante il decorso della reazione e ciò è dovuto al fatto che il controllo della reazione sull’enzima non è ottimale, rimanendo pur sempre accettabile. Per quanto riguarda la separazione, questa non può avvenire tramite centrifugazione perché si formano dei complessi elettrostatici tra il polimero formatosi, protonato, quindi carico positivamente, e l’enzima carico negativamente poiché al di sotto del proprio punto isoelettrico. Si sceglie quindi di filtrare su allumina, sciacquare con metanolo e far precipitare il polimero in acetone.

Il prodotto è caratterizzato tramite ICP-OES per quanto riguarda il contenuto di rame, con spettroscopia UV-Vis per essere certi del risultato ottenuto. Lo spettro registrato viene confrontato con quello dello stesso polimero, ottenuto però mediante polimerizzazione radicalica libera (FRP).

L’attività ossidasica dell’enzima laccasi è stata studiata in più occasioni durante il decorso della reazione. Per fare questo si misura il cambiamento di assorbanza dovuto all’ossidazione (catalizzata appunto da laccasi) del ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-solfonato)). I risultati ottenuti suggeriscono che si ha una grande perdita di attività ossidasica sul lungo termine ^[8].

Condizioni di reazione

Gli enzimi rispetto ai catalizzatori ATRP tradizionali sono molto più influenzati dalle condizioni di reazione quali temperatura, pH, solvente, scelta dell’agente riducente ^[2]. Per esempio, nella polimerizzazione del N-vinil-pirrolidone (NVP), il pH ottimale per l’enzima glucosio ossigenasi GO_x sarebbe compreso tra 5.0 e 5.5^[9]. Tuttavia, a pH acidi l’NVP tende a dare idrolisi, dunque si conduce la reazione a pH neutri. Chiaramente questo va a ridurre l’attività catalitica dell’enzima, ma trovare un compromesso è fondamentale in questo tipo di reazioni.

Un altro fattore determinante è il media di reazione scelto; nella maggior parte dei casi d’interesse si svolgono reazioni in ambiente acquoso. Questo potrebbe essere un problema per quei monomeri idrofobici, senonché è possibile scegliere opportunamente un co-solvente. Va chiarito che se anche è possibile diminuire la polarità del solvente, non sono mai state documentate fino ad ora reazioni di successo in solventi completamente organici. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che il solvente organico va a danneggiare le qualità dei biocatalizzatori ^[9].

Un problema generico delle RDRP (reversible deactivation radical polymerization), tra cui compare l’ATRP, è la presenza di ossigeno molecolare nell’ambiente di reazione ^[10]. Per ovviare a questo

inconveniente è possibile utilizzare l'enzima GO_x . Infatti questo catalizza la reazione di riduzione dell'ossigeno ad acqua ossigenata, ossidando il glucosio a D-glucosio- δ -lattone. Accoppiando poi al GO_x l'enzima HRP è possibile combinare l'effetto iniziatore a quello di deossigenazione. Tuttavia questa opzione potrebbe essere problematiche in ATRP, poiché l'acqua ossigenata causa l'ossidazione di metalli come il rame, che possono essere presenti nei catalizzatori, quindi si introduce piruvato di sodio come agente sacrificale, il quale verrà ossidato al posto degli atomi metallici ^[11]. Tramite questo "artificio" la polimerizzazione del poli-(etilenglicole) metacrilato (PEGMA) è andata a buon fine.

Confronto tra bioATRP condotte in soluzione e bioATRP condotte in superficie (SI-bioATRP)

Tutti i casi fino adesso riportati, sono polimerizzazioni ATRP condotte in soluzione. I risultati sono sicuramente soddisfacenti; a titolo di esempio si riporta la polimerizzazione mediante emoglobina del poli (etilenglicole) acrilato (PEGA) e del PEGMA. L'emoglobina è una proteina facilmente ottenibile dagli scarti dell'industria alimentare della carne, in particolare per centrifugazione degli erocitri e successiva lisi con etere ^[12].

L'emoglobina, tuttavia, possiede delle cisteine sulla sua superficie che possono inficiare sulla disposizione del polimero ottenuto. Infatti se non vengono bloccate la catena polimerica inizia a propagare in prossimità delle cisteine stesse e in aggiunta, queste possono comportare il trasferimento di carica e la terminazione ^[13]. Per il blocco delle cisteine si fa reagire l'emoglobina con la maleimide. Questo composto ha una forte reattività nei confronti dei gruppi tiolici -SH, e va a formare dei legami stabili con essi. L'emoglobina trattata con maleimide ha la maggior attività catalitica a pH acidi, quindi il pH risultante dall'aggiunta di acido ascorbico come agente riducente, circa quattro, risulta essere ottimale. A questo valore di pH l'emoglobina riarrangia ad una conformazione più "rilassata", che permette un accesso migliore al gruppo eme, quindi un'attività catalitica migliore ^[14]. Tale processo è reversibile, dunque riportando il sistema a pH neutri la conformazione ritorna ad essere quella di partenza senza la perdita del gruppo eme. Sperimentalmente si ha che la cinetica è del primo ordine ^[12], e che il peso molecolare cresce linearmente con la conversione. La dispersione non è ottimale: si suppone che l'iniziazione della polimerizzazione non sia completamente uniforme.

Questo esempio è esplicativo del fatto che il carattere controllato è garantito anche in soluzione, ma una possibile alternativa per ottenere un grado di controllo ancora più alto e valori di dispersione ancora più bassi, è condurre una polimerizzazione iniziata su un supporto inerte. A tal proposito i supporti stessi vengono funzionalizzati con degli iniziatori: si utilizza pirocatecolo ^{[15][16]}, un fenolo con due gruppi idrossilici, per creare dei siti di ancoraggio stabili sul supporto, il quale spesso e volentieri è un ossido di metallo. Dopodiché si ha l'aggiunta vera e propria dell'iniziatore e può

iniziare la polimerizzazione, solo dopo aver aggiunto la miscela di monomero, catalizzatore e agente riducente.

Uno dei vantaggi delle SI-bioATRP è la modulazione dell'interazione enzima-monomero in funzione della lower critical solution temperature (LCST). Al di sopra di essa il polimero è insolubile e precipita mentre al di sotto rimane in soluzione. Quindi è conveniente impostare dei cicli di temperatura affinché per $T > LCST$ il polimero precipitato aumenti l'adesione con il (bio)catalizzatore, vista la struttura compatta, e quindi aumenti l'accesso ai monomeri al sito di propagazione, mentre per $T < LCST$ si possano svolgere dei risciacqui. In questo momento la catena non propaga ma si può separare il catalizzatore dal prodotto e preparare la superficie per altri cicli di polimerizzazione ^[12].

Approfondendo invece il ruolo del supporto nella polimerizzazione SI-bioATRP, si riporta la polimerizzazione del PEGMA mediante laccasi, su nanoparticelle di polistirene-2-idrossietilmetacrilato-divinilbenzene (PSHMD) funzionalizzate con funzionalità di 2-bromo-2-metilpropanoato (BiB), l'iniziatore. Il polimero ottenuto vale il 40% del peso delle particelle risultanti. Tecniche come l'analisi termogravimetrica (TGA) e spettroscopia infrarossa (FT-IR) hanno confermato la sintesi del polimero desiderato. L'utilizzo del PSHMD funzionalizzato garantisce una dispersione omogenea delle molecole di iniziatore e questo influisce positivamente sul controllo della polimerizzazione e sulla dispersione delle catene polimeriche ^[19]. La funzionalizzazione offre anche una protezione aggiuntiva verso i possibili inibitori di una reazione, che in soluzione raggiungono più facilmente il sito di reazione. Infine, il fatto di avere la crescita delle catene polimeriche sul supporto di polistirene, permette una separazione agevolata del prodotto dall'ambiente di reazione. La localizzazione in un determinato punto dello spazio fa sì che non siano necessari più passaggi di purificazione, ma bastino metodi meccanici, come centrifugazione, filtrazione, tecniche cromatografiche. Va però specificato che queste ultime si basano sulla differenza in termini di dimensioni dell'enzima dal prodotto, quindi se questa tende a zero, ovvero enzima e prodotto hanno le stesse dimensioni, allora l'efficienza di tali tecniche potrebbe venire meno.

Concludendo si ricorda che è possibile, mediante SI-ATRP, funzionalizzare il supporto per avere una disposizione del polimero ben specifica, utile poi per certe applicazioni che richiedono tali caratteristiche.

APPLICAZIONI

Grazie ai diversi vantaggi precedentemente trattati, le bioATRP risultano utili in diversi ambiti. In letteratura scientifica vengono riportate applicazioni in termini di caratterizzazione, sintesi di cellule artificiali aventi caratteristiche simili a quelle viventi, funzionalizzazione di cellule.

Sintesi di cellule artificiali mediante (polymerization induced self assembly (PISA))

Lo scopo principale in questo caso è quello di sintetizzare delle cellule artificiali che mimino il comportamento delle cellule naturali, per esempio per quanto riguarda l'espressione di certe proteine. È necessario quindi creare delle strutture articolate, aventi delle parti idrofobiche e delle parti idrofiliche (carattere anfipatico), in modo tale da incapsulare al loro interno ciò che si ritiene utile per l'applicazione proposta. Quindi viene usata la tecnica di polimerizzazione PISA, la quale prevede la polimerizzazione in ambiente acquoso di un monomero idrofilico, che, durante il decorso della reazione darà una struttura con le caratteristiche appena descritte. Man mano che la polimerizzazione va avanti si passa da un carattere idrofilico a uno idrofobico, fino a che, la lunghezza del polimero è tale per cui questo tende ad auto assemblarsi, formando diversi tipi di strutture, tutte con carattere anfifilico. Tali strutture possono essere micelle (già presenti in natura), vescicole (dette anche polymerisomes) o micelle worm-like (micelle allungate). L'efficienza della PISA sta nel poter incapsulare all'interno di queste strutture, in modo efficiente, carichi funzionali come proteine, biomolecole attive ecc. Inoltre scegliendo in modo ragionato la proporzione monomero:iniziatore è possibile controllare la forma finale delle strutture anfifiliche ^[25].

Sintesi di GUVs via bioATRP

Si riporta un caso di successo in questo ambito, ovvero la polimerizzazione di strutture dette vescicole giganti unilamellari, che chiameremo d'ora in poi GUVs, utilizzando come metodo di polimerizzazione una bioATRP ^[24], catalizzata da mioglobina. Il pH ottimale per questa proteina è circa 7 ^[21] ^[22], la polimerizzazione è stata avviata da un macroiniziatore idrofilo mPEG-BiB e il monomero utilizzato è 2-idrossipropil metacrilato (HPMA), comune per reazioni PISA ^[23]. La reazione è stata eseguita in un tampone fosfato, l'agente riducente è ascorbato di sodio ^[20]. La scelta di una bioATRP come metodo di polimerizzazione non è causale: gli iniziatori tradizionali necessitano di calore, il quale è sfavorevole all'attività biologica (svolta dai carichi che verranno incapsulati poi), mentre l'attivazione per irradiazione luminosa potrebbe risultare migliore. Si è pensato anche all'iniziazione tramite HRP (che funge anche da catalizzatore in questo caso) ma si ha la formazione di acqua ossigenata, non compatibile con le matrici biologiche. L'unica scelta ragionata è quella di condurre polimerizzazioni catalizzate da enzimi e iniziate secondo iniziatori bioATRP. La scelta del catalizzatore mioglobina permette di lavorare a pH neutri, favorevoli anch'essi all'ambiente biologico.

Per quanto riguarda i tempi di reazione si è notato che questi sono minori rispetto alle reazioni condotte in modo convenzionale. Le condizioni PISA rendono il consumo di monomero più efficace, si è riscontrato che già dopo 2 ore la reazione era terminata. Si può verificare anche a occhio nudo il prodotto di reazione, dato dalla torbidità della soluzione, ma l'analisi H-NMR ne è una conferma. Per concentrazioni di monomero in peso maggiori al 10% la conversione è risultata essere superiore al 90%. Al contrario per basse concentrazioni di monomero (<5%) si è riscontrata una conversione minore del 60% [25].

La concentrazione di monomero è determinante anche per la forma che assumeranno le strutture sintetizzate, infatti all'aumentare di questa, si passerà da strutture sferiche a strutture più allungate (worm-like). Un altro fattore molto importante in tal senso è il rapporto monomero:iniziatore. Partendo da concentrazioni relativamente alte di monomero, circa 20%, e diminuendo la concentrazione di iniziatore è possibile arrivare a sintetizzare strutture più consistenti, dette vescicole (vedi figura 6).

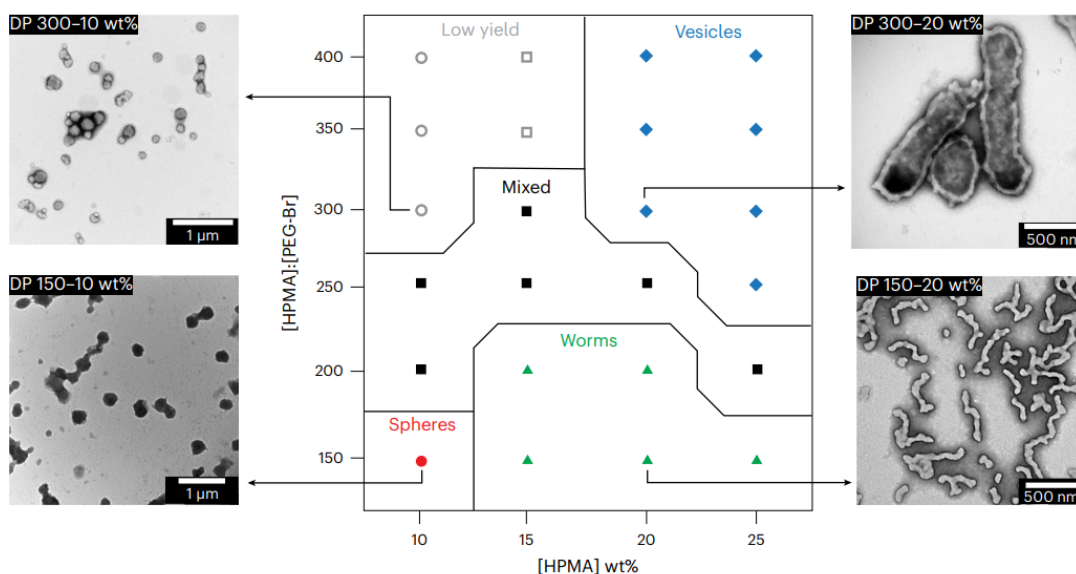


Figura 6. Diagramma riguardante la morfologia delle strutture sintetizzate in funzione della concentrazione assoluta di monomero e dal rapporto monomero:iniziatore [25]

Va fatta una precisazione riguardo il meccanismo di reazione: le fasi di iniziazione e di propagazione sicuramente sono compatibili con la bioATRP, tuttavia nel momento in cui si ha l'auto-assemblaggio delle catene, il meccanismo di reazione è verosimilmente FRP (polimerizzazione radicalica libera). Questo è suggerito dalla discrepanza tra grado di polimerizzazione stimato e grado di polimerizzazione misurato [25]. Nel momento in cui le catene polimeriche formano le strutture tridimensionali si ha un'alta concentrazione di monomero e radicali in una porzione delimitata dello spazio e questo fa sì che il controllo ATRP sulla reazione venga perso. Tuttavia, nel complesso la

reazione è controllata, tanto è vero che è possibile decidere preventivamente la forma della struttura sintetizzata.

Una volta sintetizzate le GUVs, di varia forma, è necessario essere sicuri che queste possano incapsulare efficacemente i carichi biologici ^[26] ^[27]. A tal proposito le reazioni bioPISA sono state eseguite in presenza di destrano marcato con FITC (fluorescina isotiocianato, un marker) da 40 kDa, β -galattosidasi (β -gal; 102 kDa) e nanoparticelle di silice fluorescenti (Alexa405 SiO₂ NP). L'efficienza registrata di questi carichi, insieme alla mioglobina che si incapsula di per sé, è stata dell'85% ^[25]. Tale efficienza diminuisce, intuitivamente, con l'aumentare del raggio idrodinamico delle specie da incapsulare. Va specificato che le GUVs risultano impermeabili alle macromolecole, quindi non possono perdere il loro carico una volta portata a termine la bioPISA.

Una volta incapsulate tutte le molecole necessarie, ad esclusione dell'enzima che è già presente all'interno delle GUVs, è possibile monitorare l'efficienza di reazione di queste nuove strutture. Infatti le GUVs, analogamente alle cellule naturali, fungono da nano-reattori ^[28] ^[29]. In questo caso viene monitorata la capacità di trasformare il substrato Amplex Red (substrato non fluorescente) in resorufin fluorescente, in presenza di acqua ossigenata. Ne risulta che la mioglobina svolge la sua funzione catalitica, seppur in minor qualità rispetto alla mioglobina libera. Si ipotizza che questa differenza possa essere dovuta a problemi diffusivi ma anche ad una disattivazione parziale dell'enzima stesso. La stima sul mantenimento dell'attività catalitica si aggira attorno al 20% ^[25].

Un ulteriore passo successivo è quello di accoppiare più enzimi all'interno delle GUVs, per esempio è stata monitorata la coppia mioglobina- β -gal. Il secondo è un enzima robusto, usato per l'attivazione di pro-farmaci e in ambito industriale in generale. Analogamente a quanto succede con la mioglobina, l'attività catalitica del β -gal scende al 40%. Un'altra coppia analizzata è mioglobina-GO_x ^[30], la quale ha portato ad una cascata enzimatica e alla formazione di resufin, composto fluorescente attraverso il quale è stato possibile seguire il successo di tale reazione.

Le GUVs hanno la capacità di rispondere a determinati stimoli esterni ^[31], modificando la loro conformazione. Per esempio incapsulando actina (reticolante) e filamina (funge da cross-linker nei confronti dell'actina), è stato possibile monitorare i cambiamenti indotti dal magnesio Mg²⁺ sulla struttura interna delle GUVs. Queste infatti mantenevano la dimensione in termini di diametro, ma la loro conformazione veniva modificata analogamente a quanto succede in natura nelle strutture simili al citoscheletro, anch'esse ricche di actina e filamina. Si è osservato, sempre grazie alla marcatura fluorescente, la formazione di micelle sub-compartmentalizzate, contenenti actina e actinosomi (i quali creano gusci proteici) ^[31] ^[32]. Va fatto notare che ciò non accade in assenza di Mg²⁺, dunque la

sua presenza è condizione necessaria. Questo fenomeno (cambio di conformazione) tuttavia non riguarda solo gli stimoli di natura biologica, ma anche quelli inorganici [33]. È stato sviluppato per l'appunto un sistema di bio-mineralizzazione attraverso il quale, incapsulando all'interno delle GUVs fosfatasi alcalina (ALP) e glicerofosfato di calcio, si otteneva fosfato di calcio insolubile [34]. Questo, precipitando, destabilizzava la membrana polimerica, creando una struttura ibrida organica/inorganica, utile in ambito di scienza dei materiali e architettura.

Infine si è provato a replicare le funzioni biologiche di una cellula naturale, forse uno degli aspetti più interessanti delle GUVs. In particolare sono stati incapsulati una serie di carichi con lo scopo di simulare un citoplasma e un ambiente simile alle cellule viventi. Si è sviluppata una miscela di reazione a base di E. Coli, un plasmide (filamento di DNA circolare), amminoacidi, RNA transfer e Premix (una miscela che a sua volta contiene tutte le molecole necessarie per la produzione di ATP). La capacità TX-TL, ovvero di espressione di una proteina, è stata seguita grazie alla sintesi della proteina fosforescente mClover. L'analisi svolta mostra che la maggior intensità di fluorescenza si ha nelle vescicole più piccole, questo per la concentrazione di amminoacidi maggiore. Si ha quindi la conferma della funzione simil-biologica di queste strutture complesse. Va segnalato che dopo un anno la stessa GUV mostra un'efficienza in termini di espressione proteica del $64 \pm 16\%$. Questo risultato è giustificato dal fatto che le strutture polimeriche stabilizzano le biomolecole [35], anche grazie alla formazione, nel caso dell'espressione dell'actina, di sub-compartmenti. Dunque è possibile combinare le due azioni, cioè in un primo momento esprimere una proteina, la quale in un secondo momento, andrà a deformare la struttura della GUV. In questo caso il cambio di conformazione giova alla conservazione nel tempo del carico biologico e quindi all'attività catalitica.

ATRP come metodo quantitativo per la determinazione dell'emoglobina nei fluidi biologici

L'importanza dell'emoglobina è nota e già ampiamente studiata. Determinarne quindi il contenuto in un organismo vivente è fondamentale, poiché essa svolge dei ruoli insostituibili come il trasporto di ossigeno nei vari tessuti che compongono i nostri organi. L'assenza di emoglobina porta a patologie quali l'anemia, che si presenta in varie forme. I metodi di caratterizzazione dell'emoglobina utilizzati fino ad oggi sono sicuramente efficienti ma portano con sé alcuni lati negativi. Per esempio il saggio di Drabkin, considerato metodo ufficiale, si basa sull'ossidazione e complessazione di tutte le principali specie di emoglobina con cianuri per formare cianmetoglobina stabile (HiCN) [37] [38]. È risaputo che il cianuro di potassio è un composto molto tossico e quindi i prodotti vanno smaltiti con attenzione, il che comporta un costo. Metodi fluorimetrici, elettrochimici, chemi-luminescenti sono molto sensibili, ma altrettanto costosi. Si è quindi pensato ad un tipo di caratterizzazione ecosostenibile e poco dispendiosa, che si basa su una reazione di precipitazione che coinvolge un

meccanismo ATRP. La lettura della soluzione risultante sarà di tipo ottica, in quanto il decorso della reazione comporta un intorbidimento della soluzione stessa ^[36].

Vengono quindi separati l'emoglobina, il plasma e i globuli rossi dal sangue intero per centrifugazione e trattamento con tamponi specifici. Dopodiché viene preparato l'ambiente di reazione composto da NIPAAm (N-isopropilacrilammide) e ascorbato di sodio (agente riducente). In una provetta di PMMA si aggiunge una porzione di questa soluzione, si aggiunge parte dell'emoglobina precedentemente separata in modo tale da ottenere delle soluzioni finali a differente concentrazione di quest'ultima. La provetta viene posta in uno spettrofotometro UV-Vis e termostata a 37 gradi centigradi. Per ultimo, una volta che la temperatura è stabile, si aggiunge l'iniziatore HEBIB che darà il via alla reazione. Le scansioni vengono effettuate a intervalli regolari di 30 secondi e la torbidità viene misurata come aumento dell'assorbanza a 600 nm. Un software matematico traccia una retta tra due punti sulla curva di estinzione in funzione del tempo, e la pendenza risultante sarà il tasso di torbidità ($\Delta E/\Delta t$). Il tasso di torbidità è direttamente proporzionale alla concentrazione di emoglobina, quindi attraverso un'opportuna retta di calibrazione esterna, è possibile determinarne la quantità assoluta ^[36].

La scelta dell'ATRP in questo caso è giustificata dal fatto che l'iniziatore è un alogenuro alchilico ed è più stabile rispetto al perossido di idrogeno, il quale tra l'altro favorisce reazioni secondarie. La temperatura è maggiore alla LCST del PNIPAM, dunque questo rimane in forma precipitata, aumentando la torbidità durante il decorso della reazione. I sali presenti nell'ambiente di reazione sono a concentrazione costante in tutte le provette, questo per riprodurre l'ambiente fisiologico e perché la presenza di ioni cloruro influenza l'attività dell'emoglobina. A tal proposito si è notato che all'inizio della reazione parte dell'emoglobina era legata all'ossigeno (ossi-emoglobina), il che è ragionevole in quanto quello è il suo scopo. Tale specie è segnalata dalla banda Soret a 409 nm (tipica delle proteine aventi un gruppo eme), e dalle bande a 539 e 574 nm. Una banda invece a 603 nm indica che parte dell'emoglobina è nella sua forma inattiva (metaemoglobina), dove l'atomo di ferro è in stato di ossidazione tre. Appena aggiunto l'iniziatore si nota che la banda Soret diminuisce di intensità e subisce uno shift verso 416nm. Anche le bande visibili a 539 e 574 nm diminuiscono di intensità e se ne crea una a 673 nm. Questo è spiegato dal fatto che l'ossi-emoglobina rilascia l'ossigeno legato e si addiziona ad essa un bromo dall'iniziatore. La riduzione alla forma attiva poi può avvenire per merito dell'ascorbato, ma anche dalla catena propagante. Questo però non è dato saperlo leggendo i dati sperimentali.

Per quanto riguarda le fasi successive la torbidità aumenta quasi linearmente con la concentrazione di polimero ottenuto nel tempo e con la concentrazione di emoglobina. In realtà va fatto notare che in un primo momento l'incremento non segue l'andamento teorico (si ha un rallentamento), ma questo

è dovuto alla presenza di ossigeno nell'ambiente di reazione che va consumato dai radicali, prima di procedere con la polimerizzazione vera e propria. Infatti la stessa reazione svolta in condizioni anaerobiche non presentava tali problematiche.

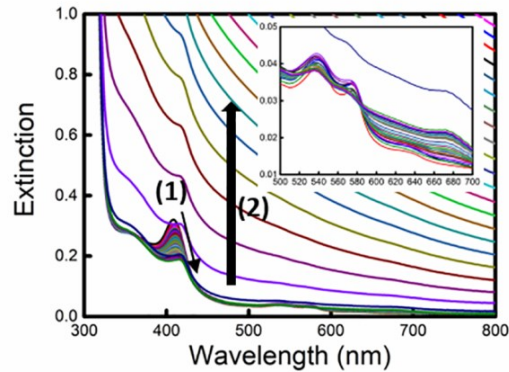


Figura 7. Spettri registrati a tempi crescenti per la polimerizzazione del NIPAM catalizzata da 0.1 mg di emoglobina [36]

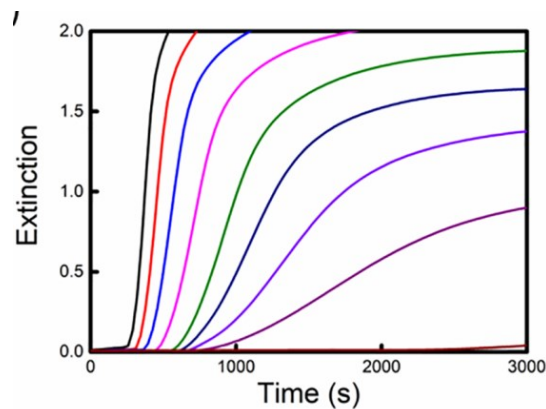


Figura 8. Andamento assorbanza nel tempo a differenti concentrazioni di emoglobina. 0.4 mg/mL (linea nera), 0.2 mg/mL (linea rossa), 0.1 mg/mL (linea blu), $5 \cdot 10^{-2}$ mg/mL (linea rosa), $2.5 \cdot 10^{-2}$ mg/mL (linea verde), $1.2 \cdot 10^{-2}$ mg/mL (linea blu scuro), $6.2 \cdot 10^{-3}$ mg/mL (linea viola), $3.1 \cdot 10^{-3}$ (linea marrone) [36]

Focalizzandoci sull'incremento della torbidità, questo non è perfettamente lineare, ma anzi viene meglio descritto da un andamento esponenziale (eq. 3.1)

$$f(x) = a + b * (1 - e^{-cx}) \quad (3.1)$$

Tale equazione è usata per interpolare i dati di torbidità in funzione della concentrazione di emoglobina (vedi figura 9)

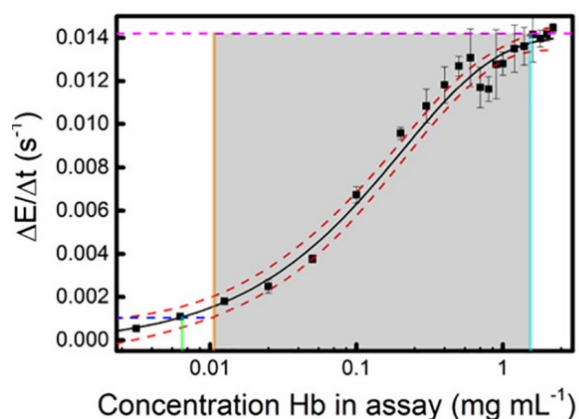


Figura 9. Plot torbidità vs concentrazione emoglobina, la linea nera continua rappresenta il fitting exp, le linee rosse tratteggiate le bande di confidenza.^[36]

A concentrazioni elevate di emoglobina la torbidità raggiunge un plateau, questo è dovuto al fatto che essendo a $T > LCST$, la formazione del PNIPAM idrofobo induce la precipitazione dell'emoglobina.

Infine si è osservato che scendendo al di sotto della LCST il PNIPAM non tornava in soluzione come si può immaginare. Si suppone che il polimero sintetizzato sia reticolato. La reticolazione forma legami covalenti che rendono difficile la ridissoluzione in acqua. Questo aspetto non è dannoso ai fini della caratterizzazione dell'emoglobina, anzi avendolo sempre precipitato è più facile la lettura della torbidità anche a diverse temperature ^[36].

Funzionalizzazione di cellule tramite bio-ATRP per modificarne le proprietà

È possibile interfacciare una cellula vivente con un materiale sintetico, con lo scopo di modificarne le proprietà. Nel caso di seguito riportato si andrà a depositare un layer di materiale polimerico sintetizzato mediante bio-ATRP ^[40]. Le cellule del lievito *S. cerevisiae* risultano propense a questa pratica ed è possibile, nella fattispecie, modificarne il fenotipo senza cambiare il codice genetico ^[47]. Si può polimerizzare PNIPAM e “clicked-PEGMA” usando come catalizzatore l'HRP ^[39]. Un polimero è detto clicked quando possiede un gruppo funzionale in grado di dare una reazione ben specifica, nel caso del PEGMA è presente il gruppo azide. Il tipo di polimerizzazione è detta anche “grafting from”, stando ad indicare che la superficie cellulare è stata funzionalizzata con l'iniziatore e che la polimerizzazione parte da lì. La cellula modificata risultante è biocompatibile ^[41] ed è possibile applicare su di essa dei coloranti fluorescenti ed enzimi non nativi ^[42].

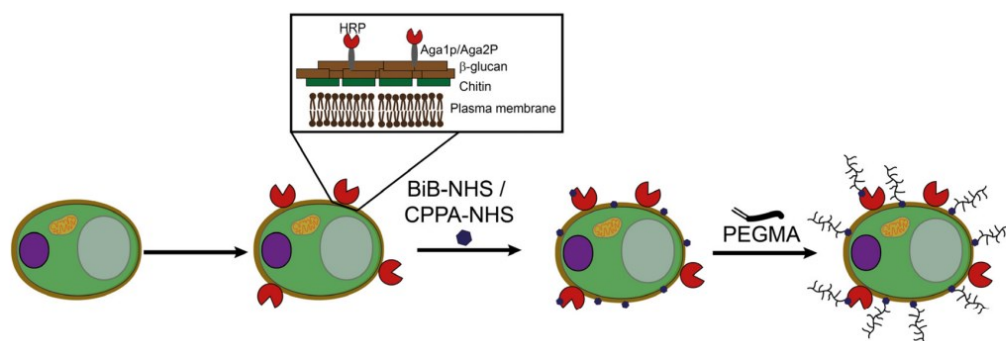


Figura 10. Schema riassuntivo della reazione desiderata ^[42].

L'enzima HRP è stato espresso dalle cellule di lievito, non aggiunto chimicamente. Le cellule sono state coltivate su un supporto di galattosio, il quale favorisce l'introduzione del gene che codifica per l'HRP. I dati di citometria di flusso dimostrano che il 40% delle cellule ha espresso questa proteina. L'attività enzimatica di tali cellule è stata indagata mediante saggio della perossidasi 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), la quale suggerisce l'impiego dell'HRP come catalizzatore ATRP. L'iniziatore ATRP bromoisobutirrato (BiB) è stato coordinato alla superficie delle cellule grazie all'N-idrossisuccinimide (NHS) essendo affine verso le lisine esposte. Il saggio della fluorescamina (quantifica i gruppi amminici primari non coniugati, quindi mancanti di iniziatore) ha confermato che il 90% delle cellule sono state raggiunte dall'iniziatore.

Rivestimento delle cellule di lievito con strati polimerici

Sono state studiate differenti combinazioni, in termini di collocazione dell'iniziatore e dell'enzima, al fine di trovare l'alternativa più efficiente per la polimerizzazione del PEGMA. Questa viene quantificata in termini di conversione (mediante H-NMR) e dispersività e peso molecolare medio numerico (mediante gel permeazione). In assenza di iniziatore o HRP, come previsto la conversione è risultata bassa (P1 vedi *tabella 1*). Confrontando la polimerizzazione, in presenza di iniziatore e HRP, prima in soluzione libera (P2) e poi legati alla superficie delle cellule (P4), si nota che le conversioni sono circa uguali ma la dispersività è minore nel secondo caso. In *tabella 1* sono riportati anche i risultati della polimerizzazione RAFT, una tecnica "living" non approfondita in questo elaborato. A tal proposito è sufficiente dire che, se anche si ottengono delle conversioni maggiori con la RAFT, la vitalità delle cellule trattate è maggiore nel caso delle ATRP.

Un test parallelo è stato condotto in assenza di HRP (l'iniziatore a differenza di P1 è presente), ottenendo una conversione del 22% (P6). Questo risultato fa supporre che la superficie cellulare abbia un'attività catalitica propria. Alla stessa soluzione è stato poi aggiunto HRP libero (P7), ma la

conversione non è migliorata. Questo evidenzia la necessità di avere il catalizzatore coniugato alla superficie, permettendo una concentrazione maggiore di questo.

Anche la polimerizzazione intercellulare non ha dato buoni risultati (P8). Su una porzione di cellule è stato addizionato l'enzima, su un'altra l'iniziatore. Dopodiché si sono combinate le due frazioni, ma i risultati sono scarsi. È necessario che sia l'iniziatore, sia il catalizzatore siano coniugati alla stessa cellula.

Infine si è cambiato il media di reazione, da PBS si è passati a una coltura di cellule lievito-peptone, YPD. I risultati registrati sono di gran lunga migliori (P9), forse per il carattere riducente dato dall'incremento del metabolismo cellulare. Anche la vitalità delle cellule è risultata essere maggiore (>80%). Il potenziale zeta ξ non subisce variazioni, se confrontato con le cellule sprovviste di polimero. Questo perché, dato il carattere idrofilico del PEG, il polimero potrebbe non coprire densamente le cellule di lievito. In YPD è stato sintetizzato un polimero clicked, già prima citato, ovvero PEGMA avente un gruppo azide esposto (P11) con buoni risultati.

Infine è stata indagata la capacità delle cellule di rivestirsi di polimero dopo il processo di gemmazione (divisione cellulare). Le cellule P14 sono state rivestite di PPEGMA e un colorante fluorescente Cy5. Si è lasciato che le cellule si riproducessero per 36 ore, periodo durante il quale il rivestimento polimerico si è diluito. Successivamente è stata condotta una nuova polimerizzazione, questa volta con PEGMA-N₃. I dati della citometria di flusso indicano che i profili sono simili, se confrontati con le prime cellule rivestite, questo indica che è possibile ripetere il processo di polimerizzazione a piacere. Questo aspetto è fondamentale per le applicazioni che prevedono l'autoassemblaggio delle cellule di lievito.

Name	1 step/2 step conjugation	Medium	Type of polymerization	HRP expression	Monomer	Monomer conversion (%)	M_n (g mol ⁻¹) (theoretical)	M_n (g mol ⁻¹) (GPC)	D (GPC)
P1	— ^a	PBS	—	—	PEGMA	7	3329	53 317	2.66
P2	1	PBS	ATRP	+	PEGMA	75	34 383	71 510	2.95
P3	1	PBS	RAFT	+	PEGMA	45	20 717	40 015	1.95
P4	2	PBS	ATRP	+	PEGMA	74	33 850	36 157	1.33
P5	2	PBS	RAFT	+	PEGMA	57	25 617	26 891	1.61
P6	2	PBS	ATRP	—	PEGMA	23	11 797	52 583	1.76
P7	2	PBS	ATRP	— ^b	PEGMA	26	12 048	55 726	1.67
P8	2 ^c	PBS	ATRP	±	PEGMA	22	10 207	45 123	2.47
P9	2	YPD	ATRP	+	PEGMA	94	42 957	33 671	1.62
P10	2	YPD	RAFT	+	PEGMA	81	37 172	36 503	1.69
P11	2	YPD	ATRP	+	PEGMA : PEGMA-N ₃ (3 : 1)	93	34 734	35 637	1.48
P12	2	YPD	ATRP	+	PEGMA : PEGMA-N ₃ (9 : 1) ^d	97	9952	48 641	1.55
P13	2	YPD	ATRP	+	PEGMA : PEGMA-N ₃ (3 : 1) ^d	50	20 163	56 102	2.04
P14	2	YPD	ATRP	+	PEGMA-N ₃	93	21 409	48 840	1.16
P15	2	YPD	ATRP	+	NIPAM	50	13 040	37 245	1.3
P16	2	YPD	ATRP	+	PEGMA-Cy5	96	42 095	57 521	1.2

PBS: phosphate-buffered saline. YPD: yeast-peptone-dextrose. ^a No initiator/CTA added, used as negative control. ^b Free HRP added to uninduced yeast. ^c NHS-BiB conjugated to cells not expressing HRP, mixed with cells expressing HRP but without initiator. ^d Chain extension in **P13** of the polymers synthesized in **P12**.

Tabella 1. Conversione, peso medio numerico teorico, peso medio numerico misurato, dispersività in funzione di varie condizioni di reazione^[42]

Una volta confermata l'efficienza di polimerizzazione, si è approfondito il cambio di comportamento delle cellule di lievito, una volta che lo strato polimerico veniva applicato. Le cellule P9 (in YPD) mostrano una crescita più lenta e una resistenza maggiore all'enzima zimolasi (enzima responsabile della degradazione della parete cellulare), questo perché il rivestimento di PEGMA rende in parte inaccessibile l'attacco dell'enzima.

È stato possibile anche aggregare più cellule, grazie all'azione reticolante dell'acido tannico che, dopo aver svolto la sua azione è stato rimosso per centrifugazione.

Un'ulteriore applicazione la si trova nella sintesi di nano particelle, vista la funzione già nota delle cellule di lievito, considerate sintetizzatrici “green” di NP^[46]. A tal proposito sono state sintetizzate AgNP con un'efficienza 13 volte maggiore alle cellule “nude”. Va fatto notare però che la vitalità delle cellule è calata drasticamente, noto il carattere biocida delle AgNP.

Nel caso invece delle nanoparticelle di platino PdNP^[45], l'efficienza è rimasta sempre alta, ma non sono stati registrati cali di vitalità.

Funzionalizzazione delle superfici

Si è testata la coniugazione di monomeri funzionali e la loro polimerizzazione sulla cellula di lievito. In particolare viene legato il monomero PEGMA-N₃ marcato con colorante Cy5 sulla superficie delle cellule P16. Viene addizionato anche l'enzima β-gal, con un'efficienza del 33%, con lo scopo di produrre *o*-nitrofenolo, che rende favorevole la proliferazione su uno strato di lattosio. Il lattosio solo in presenza dell'enzima β-gal funge da fonte principale di atomi di carbonio. In aggiunta questo

enzima rende più resistenti le cellule al detergente octil-glucopiranoside^[43]. L'enzima in questo caso catalizza la sua degradazione.

Infine viene coniugata la fosfatasi alcalina ALP, enzima che catalizza sempre la sintesi di *o*-nitrofenolo, ma che in queste condizioni induce la precipitazione di calcio fosfato per formazione di cluster intorno alle cellule, fornendo una nuova via di bio-mineralizzazione^[44].

CONCLUSIONI

La polimerizzazione ATRP catalizzata da proteine è un argomento di ricerca relativamente recente. Sicuramente negli anni a venire verranno studiati nuovi casi e verrà fatta maggior chiarezza. Se il meccanismo di catalisi, al di là di qualche caso isolato, è stato definito, non c'è un limite alle applicazioni che possono essere sviluppate implementando questa tecnica di polimerizzazione. Avendo capito quali ambiti vengono coinvolti (biomedicina, nanotecnologie ecc.) è sufficientemente chiaro che proseguire nella ricerca è fondamentale, per portare nuove risorse e metodi nella gran parte delle scienze naturali.

BIBLIOGRAFIA

- C. K. Winkler, J. H. Schrittwieser, W. Kroutil, *ACS Cent. Sci.* **2021**, 7, 55–71; [1]
- Li. R, Kong. W, An. Z, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2022**, 61, 1-11 [2]
- M. D. Green, M. H. Allen Jr., J. M. Dennis, D. S.-d. I. Cruz, R. Gao, K. I. Winey and T. E. Long, *Eur. Polym. J.*, **2011**, 47, 486–496. [3]
- Z. Ajji and A. M. Ali, *J. Hazard. Mater.*, **2010**, 173, 71–74. [4]
- H. Bessbousse, T. Rhlalou, J. F. Verchère and L. Lebrun, *Chem. Eng. J.*, **2010**, 164, 37–48. [5]
- R. Malkin, B. G. Malmström and T. Vänngård, *Eur. J. Biochem.*, **1969**, 7, 253–259. [6]
- K. Piontek, M. Antorini and T. Choinowski, *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277, 37663–37669. [7]
- Fodor, C., Gajewska, B., Rifaie-Graham, O., Apebende, E. A., Pollard, J., & Bruns, N. Laccase-catalyzed controlled radical polymerization of N-vinylimidazole. *Polymer Chemistry*, **2016**, 7(43), 6617-6625. [8]
- Ruoyu L., Kong W., and Zesheng A., *Macromolecules*, **2023** 56 (3), 751-761 [9]
- N. Li, X.-C. Pan, *Chin. J. Polym. Sci.* **2021**, 39, 1084–1092 [10]
- A. E. Enciso, L. Fu, A. J. Russell, K. Matyjaszewski, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, 57, 933–936; *Angew. Chem.* **2018**, 130, 945–948. [11]
- K. J. Rodriguez, M. M. Pellizzoni, M. Divandari, E. M. Benetti, N. Bruns, ‘Biocatalytic ATRP in solution and on surfaces’, in ‘*Methods in Enzymology*’, Vol. 627, Eds. N. Bruns, K. Loos, Academic Press, **2019**, pp. 264–287 [12]
- Silva, T. B., Spulber, M., Kocik, M. K., Seidi, F., Charan, H., Rother, M., et al. Hemoglobin and red blood cells catalyze atom transfer radical polymerization. *Biomacromolecules*, **2013** 14(8), 2703–2712. [13]
- Divandari, M., Pollard, J., Dehghani, E., Bruns, N., & Benetti, E. M. Controlling enzymatic polymerization from surfaces with switchable bioaffinity. *Biomacromolecules*, **2017**, 18(12), 4261–4270. [14]
- Amstad, E., Gillich, T., Bilecka, I., Textor, M., & Reimhult, E. Ultrastable iron oxide nanoparticle colloidal suspensions using dispersants with catechol-derived anchor groups. *Nano Letters*, **2009**, 9(12), 4042–4048. [15]

- Malisova, B., Tosatti, S., Textor, M., Gademann, K., & Zurcher, S. (2010). Poly(ethylene glycol) adlayers immobilized to metal oxide substrates through catechol derivatives: Influence of assembly conditions on formation and stability. *Langmuir*, 26(6), 4018–4026 [16]
- Ng, Y.-H., di Lena, F., & Chai, C. L. L. (2011). Metalloenzymatic radical polymerization using alkyl halides as initiators. *Polymer Chemistry*, 2(5), 589-594 [19]
- Benetti, E. M., Dehghani, E. S., Divandari, M., Pollard, J., & Bruns, N. (2024). Laccase-Catalyzed Controlled Radical Polymerization of N-Vinylimidazole. *Nature Chemistry*, 16(4), 564-574. [20]
- Silva, T. B. et al. Hemoglobin and red blood cells catalyze atom transfer radical polymerization. *Biomacromolecules* 14, 2703–2712 (2013). [21]
- Divandari, M., Pollard, J., Dehghani, E., Bruns, N. & Benetti, E. M. Controlling enzymatic polymerization from surfaces with switchable bioaffinity. *Biomacromolecules* 18, 4261–4270 (2017). [22]
- Penfold, N. J. W., Yeow, J., Boyer, C. & Armes, S. P. Emerging trends in polymerization-induced self-assembly. *ACS Macro Lett.* 8, 1029–1054 (2019). [23]
- Liu, C., Hong, C. Y. & Pan, C. Y. Polymerization techniques in polymerization-induced self-assembly (PISA). *Polym. Chem.* 11, 3673–3689 (2020). [24]
- Belluati, A., Jimaja, S., Chadwick, R. J., Glynn, C., Chami, M., Happel, D., Guo, C., Kolmar, H., & Bruns, N. (2024). Artificial cell synthesis using biocatalytic polymerization-induced self-assembly. *Nature Chemistry*, 16(4), 564–574 [25]
- Seo, H. & Lee, H. Recent developments in microfluidic synthesis of artificial cell-like polymersomes and liposomes for functional bioreactors. *Biomicrofluidics* 15, 021301 (2021) [26]
- Emir Diltemiz, S. et al. Use of artificial cells as drug carriers. *Mater. Chem. Front.* 5, 6672–6692 (2021). [27]
- Elani, Y. Interfacing living and synthetic cells as an emerging frontier in synthetic biology. *Angew. Chem. Int. Ed.* 60, 5602–5611 (2021). [28]
- Belluati, A., Craciun, I., Meyer, C. E., Rigo, S. & Palivan, C. G. Enzymatic reactions in polymeric compartments: nanotechnology meets nature. *Curr. Opin. Biotechnol.* 60, 53–62 (2019). [29]
- Kelman, D. J., DeGray, J. A. & Mason, R. P. Reaction of myoglobin with hydrogen peroxide forms a peroxy radical which oxidizes substrates. *J. Biol. Chem.* 269, 7458–7463 (1994). [30]
- Janmey, P. A. & McCulloch, C. A. Cell mechanics: integrating cell responses to mechanical stimuli. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 9, 1–34 (2007). [31]

- Ganar, K. A., Leijten, L. & Deshpande, S. Actinosomes: condensate-templated containers [31]
for engineering synthetic cells. *ACS Synth. Biol.* 11, 2869–2879 (2022).
- Deshpande, S. & Pfohl, T. Real-time dynamics of emerging actin networks in cell- [32]
mimicking compartments. *PLoS ONE* 10, e0116521 (2015)
- Dauphin, Y. A brief history of biomineralization studies. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 9, 1774– [33]
1790 (2022)
- Cosmidis, J. et al. Calcium-phosphate biomineralization induced by alkaline phosphatase [34]
activity in *Escherichia coli*: localization, kinetics, and potential signatures in the fossil
record. *Front. Earth Sci.* 3, (2015).
- Matoori, S. & Leroux, J.-C. Twenty-five years of polymersomes: lost in translation? *Mater.* [35]
Horizons 7, 1297–1309 (2020).
- Pollard, J., Rifaie-Graham, O., Raccio, S., Davey, A., Balog, S., & Bruns, N. (2020). [36]
Biocatalytically Initiated Precipitation Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP) as a
Quantitative Method for Hemoglobin Detection in Biological Fluids. *Analytical Chemistry*,
92(2), 1162-1170.
- Acker, J. P.; M. Croteau, I.; Yi, Q.-L. *Clin. Chim. Acta* 2012, 413 (21–22), 1746–1752 [37]
- Balasubramaniam, P.; Malathi, A. J. *Postgrad. Med.* 1992, 38 (1), 8. [38]
- D. Lipovsek, E. Antipov, K. A. Armstrong, M. J. Olsen, A. M. Klibanov, B. Tidor and K. D. [39]
Wittrup, *Chem. Biol.*, 2007, 14, 1176–1185.
- J. Y. Kim, B. S. Lee, J. Choi, B. J. Kim, J. Y. Choi, S. M. Kang, S. H. Yang and I. S. Choi, [40]
Angew. Chem., Int. Ed., 2016, 55, 15306–15309.
- X. Y. Liu, J. M. Nothias, A. Scavone, M. Garfinkel and J. M. Millis, *ASAIO J.*, 2010, 56, [41]
241–245.
- Belluati, A., Happel, D., Erbe, M., Kirchner, N., Szelwicka, A., Bloch, A., Berner, V., [42]
Christmann, A., Hertel, B., Pardehkhorrani, R., Reyhani, A., Kolmar, H., & Bruns, N.
(2023). Self-decorating cells via surface-initiated enzymatic controlled radical
polymerization. *Nanoscale*, 15(2023), 19486–19492.
- H. Lee, J. Park, N. Kim, W. Youn, G. Yun, S. Y. Han, D. T. Nguyen and I. S. Choi, *Adv.* [43]
Mater., 2022, 34, 2201247.
- G. M. Gadd, *Curr. Biol.*, 2021, 31, R1557–R1563. [44]
- N. Saitoh, R. Fujimori, T. Yoshimura, H. Tanaka, A. Kondoh, T. Nomura and Y. Konishi, [45]
Hydrometallurgy, 2020, 196, 105413

A. Boroumand Moghaddam, F. Namvar, M. Moniri, P. Md Tahir, S. Azizi and R. Mohamad, [46]
Molecules, **2015**, 20, 16540–16565.

W. Youn, J. Y. Kim, J. Park, N. Kim, H. Choi, H. Cho and I. S. Choi, *Adv. Mater.*, **2020**, 32, [47]
1907001.