ABSTRACT

Recent advances in protein biophysics have shifted the understanding of neurodegenerative disease-associated proteins from static structural entities to highly dynamic systems whose behavior is strongly governed by their physicochemical environment. In particular, intrinsically disordered proteins (IDPs), such as the huntingtin exon-1 fragment, exhibit complex aggregation pathways that are highly sensitive to molecular crowding, phase organization, and external modulators. This thesis, titled ***"Understanding Huntingtin Protein Aggregation in Cell-Mimicking Environments"***, presents a comprehensive investigation of the aggregation behavior of the HD39Q mutant of huntingtin protein under conditions that progressively approximate the intracellular milieu.

Chapter 1 entitled "Introduction": The work begins with a detailed introduction to the concepts of protein aggregation, macromolecular crowding, and liquid–liquid phase separation (LLPS), emphasizing how cellular environments differ significantly from dilute in vitro systems. The scope of the thesis is defined by the need to bridge this gap by studying aggregation under increasingly complex and physiologically relevant conditions.

Chapter 2 entitled "**Materials and Methods"**: outlines the materials and experimental methodologies employed throughout the study. The HD39Q protein was expressed recombinantly in *E. coli* and purified using affinity chromatography techniques. A combination of spectroscopic, single-molecule, and imaging approaches was utilized to probe protein structure, dynamics, and aggregation. Circular dichroism (CD) and intrinsic fluorescence spectroscopy were used to assess conformational properties, while Thioflavin-T (ThT) assays were employed to monitor aggregation kinetics. Techniques such as fluorescence correlation spectroscopy (FCS), dynamic light scattering (DLS), nanoparticle tracking analysis (NTA), and size-exclusion chromatography (SEC) provided insights into diffusion behavior, size distributions, and oligomer populations. Confocal and scanning electron microscopy (SEM) enabled visualization of aggregation morphology and spatial organization under different environmental conditions.

Chapter 3 entitled "Huntingtin Protein Aggregation in Cell-Mimicking Environments": This chapter focuses on the aggregation behavior of HD39Q in the presence of individual macromolecular crowding agents, including Dextran (D40, D70), Ficoll 70, and polyethylene glycol (PEG 8). The results demonstrate that crowding significantly alters aggregation kinetics, reducing lag times and enhancing fibril formation. Distinct crowder-specific effects were observed, reflecting differences in polymer architecture, excluded volume, and solvent interactions. Concentration-dependent studies revealed signatures consistent with nucleation-dependent aggregation involving secondary pathways. Complementary techniques such as NTA and FCS provided insight into early oligomer formation and size evolution, while imaging studies revealed differences in aggregate morphology under crowded conditions.

Chapter 4 entitled "Crowder Induced Phase Separation Modulates the Huntingtin Protein Aggregation Landscape": Building upon single-crowder systems, Chapter 4 investigates the role of mixed crowding and phase separation in modulating huntingtin aggregation. Binary and ternary mixtures of crowders were employed to generate phase-separated environments resembling aqueous two-phase systems. Under these conditions, HD39Q exhibited complex aggregation behavior characterized by biphasic kinetics, indicating the presence of distinct nucleation and maturation regimes. Confocal imaging revealed phase-selective localization of protein aggregates, with initial accumulation at phase interfaces followed by internal fibril growth within droplets. The study further demonstrates that variations in crowder composition and ratio significantly influence aggregation pathways, droplet morphology, and temporal evolution, highlighting the role of mesoscale organization in directing protein aggregation.

Chapter 5 entitled "Mechanistic Insights into Polyphenol-Mediated Modulation of Huntingtin Aggregation: A Multi-technique Approach": This chapter explores the modulation of HD39Q aggregation using small-molecule polyphenols, including myricetin, curcumin, epigallocatechin gallate (EGCG), and resveratrol. Using a multi-technique approach, the effects of these compounds on aggregation kinetics, aggregate size, and morphology were systematically examined. ThT assays revealed that polyphenols primarily delay aggregation onset, with varying degrees of inhibition depending on their chemical structure. Among the compounds studied, myricetin exhibited the most pronounced effect. Additional experiments involving combinations of polyphenols and time-dependent addition strategies provided further insights into their influence on different stages of aggregation.

Complementary techniques, including DLS, SEC, FCS, and imaging, were used to assess changes in aggregate populations and structural characteristics.

Chapter 6 entitled "Conclusions and Future Perspectives": Finally, the thesis integrates these findings to provide a cohesive framework for understanding huntingtin aggregation under cell-mimicking conditions. By systematically incorporating macromolecular crowding, phase separation, and small-molecule modulation, this work presents a multi-scale perspective on protein aggregation. The results highlight the importance of environmental complexity in governing aggregation pathways and emphasize the need for studying such processes under conditions that closely resemble the intracellular environment.

सारांश

प्रोटीन बायोफिजिक्स में हाल की प्रगति ने न्यूरोडीजेनेरेटिव बीमारियों से जुड़े प्रोटीनों की समझ को स्थिर संरचनात्मक इकाइयों से हटाकर अत्यधिक गतिशील प्रणालियों की ओर मोड़ दिया है, जिनका व्यवहार उनके भौतिक-रासायनिक वातावरण द्वारा दृढ़ता से नियंत्रित होता है। विशेष रूप से, आंतरिक रूप से अव्यवस्थित प्रोटीन (IDPs), जैसे कि हंटिंग्टिन एक्सॉन-1 खंड—जटिल एकत्रीकरण मार्ग प्रदर्शित करते हैं, जो आणविक भीड़ (molecular crowding), चरण संगठन और बाहरी संशोधकों के प्रति अत्यधिक संवेदनशील होते हैं। "कोशिका-सदृश वातावरण में हंटिंग्टिन प्रोटीन एकत्रीकरण को समझना" शीर्षक वाली यह थीसिस, हंटिंग्टिन प्रोटीन के HD39Q म्यूटेंट के एकत्रीकरण व्यवहार की एक व्यापक जांच प्रस्तुत करती है; यह जांच ऐसी स्थितियों के तहत की गई है जो धीरे-धीरे कोशिका के आंतरिक वातावरण (intracellular milieu) के करीब पहुँचती हैं।

अध्याय 1, जिसका शीर्षक है "परिचय": यह कार्य प्रोटीन एकत्रीकरण, मैक्रोमोलेक्यूलर भीड़ और तरल-तरल चरण पृथक्करण (LLPS) की अवधारणाओं के विस्तृत परिचय के साथ शुरू होता है, जिसमें इस बात पर जोर दिया गया है कि कोशिकीय वातावरण तनु *इन विट्रो* (in vitro) प्रणालियों से किस प्रकार काफी भिन्न होते हैं। थीसिस का दायरा इस अंतर को पाटने की आवश्यकता द्वारा परिभाषित किया गया है, जिसके लिए उत्तरोत्तर अधिक जटिल और शारीरिक रूप से प्रासंगिक स्थितियों के तहत एकत्रीकरण का अध्ययन किया जाता है।

अध्याय 2, जिसका शीर्षक है "सामग्री और विधियाँ": इस पूरे अध्ययन के दौरान उपयोग की गई सामग्रियों और प्रयोगात्मक पद्धतियों की रूपरेखा प्रस्तुत करता है। HD39Q प्रोटीन को *E. coli* में पुनर्संयोजक रूप से व्यक्त (expressed) किया गया और एफिनिटी क्रोमैटोग्राफी तकनीकों का उपयोग करके शुद्ध किया गया। प्रोटीन की संरचना, गतिशीलता और एकत्रीकरण की जांच के लिए स्पेक्ट्रोस्कोपिक, एकल-अणु और इमेजिंग दृष्टिकोणों के संयोजन का उपयोग किया गया। संरूपण गुणों का आकलन करने के लिए सर्कुलर डाइक्रोइज्म (CD) और आंतरिक प्रतिदीप्ति स्पेक्ट्रोस्कोपी का उपयोग किया गया, जबकि एकत्रीकरण की गतिशीलता (kinetics) की निगरानी के लिए थियोफ्लेविन-T (ThT) परख (assays) का प्रयोग किया गया। प्रतिदीप्ति सहसंबंध स्पेक्ट्रोस्कोपी (FCS), गतिशील प्रकाश प्रकीर्णन (DLS), नैनोकण ट्रैकिंग विश्लेषण (NTA) और आकार-अपवर्जन क्रोमैटोग्राफी (SEC) जैसी तकनीकों ने विसरण व्यवहार, आकार वितरण और ओलिगोमर आबादी के बारे में अंतर्दृष्टि प्रदान की। कन्फोकल और स्कैनिंग इलेक्ट्रॉन माइक्रोस्कोपी (SEM) ने विभिन्न पर्यावरणीय स्थितियों के तहत एकत्रीकरण की आकृति विज्ञान और स्थानिक संगठन के दृश्यावलोकन को संभव बनाया।

अध्याय 3, जिसका शीर्षक है "कोशिका-सदृश वातावरण में हंटिंग्टिन प्रोटीन एकत्रीकरण":

यह अध्याय व्यक्तिगत मैक्रोमोलेक्यूलर भीड़-कारक (crowding agents)—जिनमें डेक्सट्रान (D40, D70), फिकोल 70 और पॉलीइथाइलीन ग्लाइकोल (PEG 8) शामिल हैं—की उपस्थिति में HD39Q के एकत्रीकरण व्यवहार पर केंद्रित है। परिणाम दर्शाते हैं कि भीड़ (crowding) एकत्रीकरण की गतिशीलता को काफी हद तक बदल देती है, जिससे विलंब काल (lag times) कम हो जाता है और तंतु (fibril) निर्माण में वृद्धि होती है। पॉलीमर संरचना, बहिष्कृत आयतन और विलायक अंतःक्रियाओं में अंतर को दर्शाते हुए,

क्राउडर-विशिष्ट विशिष्ट प्रभाव देखे गए। सांद्रता-निर्भर अध्ययनों से द्वितीयक मार्गों से जुड़े नाभिकीयकरण-निर्भर एकत्रीकरण के अनुरूप संकेत प्राप्त हुए। एनटीए और एफसीएस जैसी पूरक तकनीकों ने प्रारंभिक ऑलिगोमर निर्माण और आकार विकास की जानकारी प्रदान की, जबकि इमेजिंग अध्ययनों ने भीड़भाड़ वाली स्थितियों में समुच्चय आकृति विज्ञान में अंतर प्रकट किया।

अध्याय 4 जिसका शीर्षक है "क्राउडर प्रेरित चरण पृथक्करण हंटिंग्टिन प्रोटीन एकत्रीकरण परिदृश्य को नियंत्रित करता है": एकल-क्राउडर प्रणालियों पर आधारित, अध्याय 4 हंटिंग्टिन एकत्रीकरण को नियंत्रित करने में मिश्रित भीड़ और चरण पृथक्करण की भूमिका की जांच करता है। जलीय द्वि-चरण प्रणालियों के समान चरण-पृथक वातावरण उत्पन्न करने के लिए क्राउडर्स के द्विआधारी और त्रिआधारी मिश्रणों का उपयोग किया गया। इन परिस्थितियों में, एचडी39क्यू ने द्वि-चरण गतिकी द्वारा चिह्नित जटिल एकत्रीकरण व्यवहार प्रदर्शित किया, जो विशिष्ट नाभिकीयकरण और परिपक्वता व्यवस्थाओं की उपस्थिति को दर्शाता है। कॉन्फोकल इमेजिंग से प्रोटीन एग्रीगेट्स का फेज-सेलेक्टिव लोकलाइज़ेशन सामने आया, जिसमें फेज इंटरफेस पर प्रारंभिक संचय के बाद बूंदों के भीतर आंतरिक फाइब्रिल वृद्धि देखी गई। अध्ययन से यह भी पता चलता है कि क्राउडर संरचना और अनुपात में भिन्नता एग्रीगेशन मार्गों, बूंद की आकृति और लौकिक विकास को महत्वपूर्ण रूप से प्रभावित करती है, जो प्रोटीन एग्रीगेशन को निर्देशित करने में मेसोस्केल संगठन की भूमिका को उजागर करती है।

अध्याय 5, जिसका शीर्षक है "हंटिंग्टिन एकत्रीकरण के पॉलीफेनोल-मध्यस्थता वाले मॉड्यूलेशन में यांत्रिक अंतर्दृष्टि: एक बहु-तकनीकी दृष्टिकोण": यह अध्याय छोटे-अणु वाले पॉलीफेनोल—जिनमें मिरिसेटिन, करक्यूमिन, एपिगैलोकैटेचिन गैलेट (EGCG), और रेसवेराट्रोल शामिल हैं—का उपयोग करके HD39Q एकत्रीकरण के मॉड्यूलेशन की पड़ताल करता है। एक बहु-तकनीकी दृष्टिकोण का उपयोग करते हुए, एकत्रीकरण की गतिजता, एकत्रीकरण के आकार और आकारिकी पर इन यौगिकों के प्रभावों की व्यवस्थित रूप से जांच की गई। ThT परीक्षणों से पता चला कि पॉलीफेनोल मुख्य रूप से एकत्रीकरण की शुरुआत में देरी करते हैं, और उनके रासायनिक संरचना के आधार पर अवरोध की मात्रा अलग-अलग होती है। अध्ययन किए गए यौगिकों में, मिरिसेटिन ने सबसे अधिक स्पष्ट प्रभाव दिखाया। पॉलीफेनोल के संयोजन और समय-आधारित संयोजन रणनीतियों से जुड़े अतिरिक्त प्रयोगों ने एकत्रीकरण के विभिन्न चरणों पर उनके प्रभाव के बारे में और अधिक अंतर्दृष्टि प्रदान की। एकत्रीकरण समूहों और संरचनात्मक विशेषताओं में होने वाले परिवर्तनों का आकलन करने के लिए DLS, SEC, FCS, और इमेजिंग सहित पूरक तकनीकों का उपयोग किया गया।

अध्याय 6, जिसका शीर्षक है "निष्कर्ष और भविष्य के दृष्टिकोण": अंत में, यह शोध-प्रबंध इन निष्कर्षों को एकीकृत करता है ताकि कोशिका-सदृश परिस्थितियों में हंटिंग्टिन एकत्रीकरण को समझने के लिए एक सुसंगत ढांचा प्रदान किया जा सके। मैक्रोमोलेक्यूलर क्राउडिंग, चरण पृथक्करण (phase separation), और छोटे-अणु मॉड्यूलेशन को व्यवस्थित रूप से शामिल करके, यह कार्य प्रोटीन एकत्रीकरण पर एक बहु-स्तरीय दृष्टिकोण प्रस्तुत करता है। परिणाम एकत्रीकरण मार्गों को नियंत्रित करने में पर्यावरणीय जटिलता के महत्व को उजागर करते हैं और ऐसी प्रक्रियाओं का अध्ययन उन परिस्थितियों में करने की आवश्यकता पर जोर देते हैं जो कोशिका के आंतरिक वातावरण (intracellular environment) से काफी हद तक मिलती-जुलती हों।