

**POLYPHENOL-BASED STRATEGIES TO INHIBIT
 γ D-CRYSTALLIN AGGREGATION AND THEIR ENCAPSULATION
FOR IMPROVED DELIVERY**

Vishakha Goswami



**Department of Chemistry
Indian Institute of Technology Delhi**

June 2025

© Indian Institute of Technology Delhi (IITD), New Delhi, 2025

**POLYPHENOL-BASED STRATEGIES TO INHIBIT
 γ D-CRYSTALLIN AGGREGATION AND THEIR ENCAPSULATION
FOR IMPROVED DELIVERY**

by

**Vishakha Goswami
Department of Chemistry**

Submitted

**in fulfilment of the requirements of the degree of Doctor of Philosophy
to the**



Indian Institute of Technology Delhi

June 2025

Dedicated to

My Family

For Endless love and Support

CERTIFICATE

This is to certify that the thesis titled “Polyphenol-Based Strategies to Inhibit γ D-Crystallin Aggregation and their Encapsulation for Improved Delivery,” submitted by Ms. Vishakha Goswami to the Indian Institute of Technology Delhi in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in Chemistry, is a genuine record of research work conducted by her.

Ms. Vishakha Goswami has carried out this research under my guidance and supervision, meeting the necessary standards for thesis submission. To the best of my knowledge, the results presented in this dissertation have not been submitted, either in part or in full, to any other university or institute for the award of any degree or diploma.

(Dr. Shashank Deep)

Professor

Department of Chemistry

Indian Institute of Technology, Delhi

New Delhi-110016

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my deepest gratitude to everyone who supported me throughout the journey of completing this thesis. This work would not have been possible without their guidance, encouragement, and assistance.

First and foremost, I am profoundly grateful to my supervisor, Dr. Shashank Deep, for his invaluable guidance, insightful feedback, and unwavering support. His expertise and encouragement have been instrumental in shaping this thesis and in broadening my perspective on the subject matter.

I would also like to extend my sincere thanks to the members of my thesis committee, Dr. Pramit k Chowdhury, Dr. Siddharth Pandey and Dr. Tapan K. Chaudhari for their constructive critiques and thoughtful suggestions, which greatly enhanced the quality of my work. I would further like to thank Dr. Ashwani K. Thakur, IIT Kanpur for providing γ D-crytallin plasmid.

A heartfelt thank you goes to my family and friends, Dr. Namra, Reena and Palak whose unwavering belief in me and constant encouragement provided the motivation I needed during challenging times. To my parents, Mr. Suresh Kumar Goswami and Mrs. Rita Goswami, my brothers Mr. Abhishek Goswami and Mr. Kanishk Goswami, my sister-in-law, Ms. Anjali Sharma, thank you for your unconditional love and support. Lots of love to my precious nephew, Vivvan Goswami, whose smile takes away all the stress one has.

I am also grateful to my colleagues and peers at IIT Delhi for their camaraderie and for fostering an environment of collaboration and learning. Special thanks to Dr. Amrita, Dr. Sonam, Dr. Nitika, Dr. Shilpa, Dr. Ishrat, Vijay, Hirah, Teena, Aditi, Sony, Abhinav, Yashika and Shri for their assistance and encouragement.

Finally, I wish to acknowledge the support of IIT Delhi for providing the financial assistance that made this research possible.

To all those who contributed to this work, directly or indirectly, your support has meant the world to me, and I am deeply appreciative of your role in my journey.

Lastly, A big thank you to God Almighty.

Thank you.

ABSTRACT

Protein folding is a post-translational process where a newly synthesized polypeptide chain adopts a stable and functional three-dimensional structure through intermediate stages. Errors in this process can result in misfolded proteins, which are usually eliminated by the cell. However, when the removal system is overwhelmed, these proteins accumulate, forming aggregates. These aggregates can be amorphous or have organized amyloid-like β -sheet structures. These aggregates are linked to over 30 diseases, including cataracts caused by crystallin protein aggregates. Cataracts are a leading cause of blindness worldwide, predominantly affecting the elderly. Studies suggest that long-living individuals face a high risk of developing cataracts.

Crystallins are classified into three groups— α , β , and γ —each with subclasses. Among these, human γ D-crystallin is associated with cataracts and plays a crucial role in the disease's progression. Factors such as aging, mutations, and environmental stress cause γ D-crystallin to aggregate in lens fiber cells. These aggregates scatter light, impairing the lens's ability to focus it on the retina, leading to poor vision.

Currently, the only effective treatment is surgical replacement of the affected lens with an artificial one. However, challenges such as surgical side effects, limited access to facilities for surgery and costs associated with it, especially in developing countries, highlight the need for affordable and accessible alternatives. Developing a drug that can prevent or delay crystallin aggregation could be a potential solution. While some small molecules have shown promise *in vitro*, none have advanced to clinical trials. Similar approaches have been explored for other amyloid diseases, with some drugs undergoing clinical trials. Curcumin, quercetin and baicalein act as potent anti-amyloidogenic and fibril destabilizing agents for SOD1 fibrils, and few others. Quercetin, baicalein, curcumin belongs to group of class known as polyphenols.

Polyphenols are natural occurring compounds which have antioxidant, anti-inflammatory properties. Due to these properties, polyphenols can act as potential drug for aggregation prone disease like cataract. Despite these properties, polyphenols have limitations such as less water solubility and prone to degradation and aggregation. These limitations can be overcome by encapsulation systems made up of biodegradable polymers like chitosan, TPP and PLGA.

This thesis is entitled as "Polyphenol-Based Strategies to Inhibit γ D-crystallin Aggregation and their Encapsulation for Improved Delivery”.

The research aims to look at the aggregation of γ D-crystallin established under different conditions, uncover a potential polyphenol for its inhibition followed by encapsulation of the polyphenol in biodegradable nanoparticles and finally using polyphenol loaded biodegradable nanoparticles as potential drug for disease like cataract. The thesis is organized into seven chapters, each addressing these objectives.

Chapter 1: This chapter presents a review of the existing literature on protein and diseases caused by aggregation of proteins. It then discusses cataracts, with a specific focus on the role of crystallin protein aggregation in their development. It systematically explores the various factors contributing to crystallin aggregation while providing a detailed overview of the eye's components, including the structure, stability, and functions of different crystallin protein types. The chapter further discusses the encapsulation of polyphenols in chitosan- based nanoparticles.

Finally, the chapter concludes by outlining the hypothesis and research objectives aimed at optimizing various condition for aggregation of γ D-crystallin. Investigating a potential polyphenol for inhibition of aggregation of γ D-crystallin and finally fabrication of polyphenol loaded nanoparticles. Study of these nano complex was done in a elaborate manner. At the end of this chapter,

the origin of the scientific problem, objectives designed for this thesis, and outline of the research work performed were discussed.

Chapter 2: This chapter details the chemicals procured for protein expression and purification aggregation-related experiments, emphasizing their relevance and application in the study. It also discusses the principles underlying the use of experimental and computational techniques employed in the research. Furthermore, the chapter provides comprehensive information about the various analyses performed, offering insights into the methodologies and their significance in finding a potential drug (polyphenol). Chapters 3-7 present all the experimental work done in this thesis.

Chapter 3: In this chapter, fabrication and characterization of chitosan-based nanoparticles is discussed. Two set of nanoparticles CS-TPP NPs and CS-PLGA NPs were fabricated, and their characterization was done by biophysical techniques like TEM, DLS, SEM and few others. Parameters like encapsulation efficiency and loading efficiency was also calculated for both polyphenol loaded nanopartilces.

Chapter 4: In the current work, we carried out an in-depth investigation of the effect of polyphenol loaded nano-formulations on the aggregation of γ D-crystallin. At first, the protein was allowed to form amorphous aggregates under denaturing conditions. Several polyphenols were then tried to inhibit the aggregation of the protein. Amongst the polyphenols tested, most effective polyphenol are found to be resveratrol and quercetin. Since polyphenols are prone to degradation, they were encapsulated in chitosan nanoparticles in order to provide an ambient condition for them to function effectively. The loading efficiency and release kinetics of polyphenols were subsequently tested. Finally, the efficacy of resveratrol/quercetin loaded chitosan nanoparticles as inhibitors for γ -D-crystallin aggregation were confirmed in a series of experiments demonstrating the potency of the system in the prospective therapeutic intervention of eye ailments associated with self-assembly of γ -D-crystallin proteins.

Chapter 5: Human eyes get exposed to UV light which can be caused by environmental changes like ozone depletion and global warming. Exposure to UV light can be a cause of cataract, one of the ocular diseases which may cause vision impairment. In our present study, we have carried out an extensive examination of polyphenols as inhibitors for UV-induced aggregation of γ D-crystallin. On exposure to UV-C light, γ D-crystallin forms fibrils instead of amorphous aggregates. Various polyphenols were tested as inhibitors, out of these quercetin, baicalein, and caffeic acid were found to be effective. As polyphenols are insoluble in water, nanoencapsulation was tried to enhance their bioavailability. CS-TPP and CS-PLGA encapsulating systems were considered as they form biodegradable nano-capsules. Out of three polyphenols (quercetin, baicalein, and caffeic acid), quercetin forms nanocarriers of smaller sizes, a must for crossing corneal/retinal barrier. Quercetin nanocarriers were considered as an effective system that could be used for therapeutic application. For these nanocarriers, encapsulation efficiency, and polyphenol release kinetics were studied. CS- PLGA NPs were found to have better loading efficiency for quercetin than CS-TPP NPs.

Chapter 6: It has been found that in cataractous lens, concentration of metal ions like copper is increased significantly as compared to a healthy lens. γ -D crystallin is one of the more abundant proteins in the core of the lens. Experimentally, it has been found that metal ions like Cu^{2+} causes nonamyloid aggregation of γ -D crystallin. Using techniques like turbidity assay, CD spectroscopy, ANS binding study and microscopic techniques like TEM , we show here that Cu^{+2} form nonamyloid aggregates. Polyphenols, like quercetin, can act as potential inhibitor for these metal-based aggregates. However, polyphenols are associated with a drawback, that is, less solubility and stability in water. To overcome this drawback, nano carriers loaded with quercetin were employed to act as inhibitors.s

Chapter 7 (Future aspects and conclusion): In this chapter briefly future aspects and conclusions from research carried out during this thesis are discussed. Future aspects involve toxicity studies, crossing of retinal barriers and few other cell culture studies.

एब्सटैक्ट

प्रोटीन फोल्डिंग एक अनुवाद के बाद की प्रक्रिया है जहाँ एक नई संश्लेषित पॉलीपेटाइड श्रृंखला मध्यवर्ती चरणों के माध्यम से एक स्थिर और कार्यात्मक त्रि-आयामी संरचना को अपनाती है। इस प्रक्रिया में त्रुटियों के परिणामस्वरूप गलत मोड़ वाले प्रोटीन हो सकते हैं, जिन्हें आमतौर पर कोशिका द्वारा समाप्त कर दिया जाता है। हालांकि, जब हटाने की प्रणाली अभिभूत हो जाती है, तो ये प्रोटीन जमा हो जाते हैं, जिससे समुच्चय बनते हैं। ये समुच्चय अनाकार हो सकते हैं या अमाइलॉइड जैसी β -शीट संरचनाओं को व्यवस्थित कर सकते हैं। ये समुच्चय 30 से अधिक बीमारियों से जुड़े हुए हैं, जिनमें क्रिस्टलीन प्रोटीन समुच्चय के कारण होने वाला मोतियाबिंद भी शामिल है। मोतियाबिंद दुनिया भर में अंधेपन का एक प्रमुख कारण है, जो मुख्य रूप से बुजुर्गों को प्रभावित करता है। अध्ययनों से पता चलता है कि लंबे समय तक जीवित रहने वाले व्यक्तियों को कम से कम एक बार मोतियाबिंद होने का उच्च जोखिम होता है।

क्रिस्टलीन को तीन समूहों में वर्गीकृत किया गया है- α , β , और γ -प्रत्येक उपवर्ग के साथ। इनमें से, मानव γ D-क्रिस्टलीन मोतियाबिंद से जुड़ा हुआ है और रोग की प्रगति में महत्वपूर्ण भूमिका निभाता है। उम्र बढ़ने, उत्परिवर्तन और पर्यावरणीय तनाव जैसे कारक γ D-क्रिस्टलीन को लेंस फाइबर कोशिकाओं में एकत्रित करने का कारण बनते हैं। ये एकत्रित प्रकाश को बिखेरते हैं, जिससे लेंस की रेटिना पर ध्यान केंद्रित करने की क्षमता कम हो जाती है, जिससे दृष्टि खराब हो जाती है।

वर्तमान में, एकमात्र प्रभावी उपचार एक कृत्रिम लेंस के साथ प्रभावित लेंस का शल्य चिकित्सा प्रतिस्थापन है। हालांकि, सर्जिकल साइड इफेक्ट, सर्जरी के लिए सुविधाओं तक सीमित पहुंच और इससे जुड़ी लागत, विशेष रूप से विकासशील देशों में, सस्ती और सुलभ विकल्पों की आवश्यकता को उजागर करती हैं। एक ऐसी दवा विकसित करना जो क्रिस्टलीन एकत्रीकरण को रोक सके या देरी कर सके, एक संभावित समाधान हो सकता है। जबकि कुछ छोटे अणुओं ने इन विट्रो में आशाजनक प्रदर्शन किया है, कोई भी नैदानिक परीक्षणों के लिए उन्नत नहीं है। अन्य अमाइलॉइड रोगों के लिए इसी तरह के तरीकों का पता लगाया गया है, जिसमें कुछ दवाओं का नैदानिक परीक्षण किया जा रहा है। करक्यूमिन, केरसेटिन और बैकालिन एसओडी1 फाइब्रिल और कुछ अन्य के लिए शक्तिशाली एंटीमाइलोइडोजेनिक और फाइब्रिल अस्थिर करने वाले एजेंटों के रूप में कार्य करते हैं।

केसेटिन, बैकालिन, करक्यूमिन पॉलीफेनोल्स के रूप में जाने जाने वाले वर्ग के समूह से संबंधित हैं।

पॉलीफेनॉल प्राकृतिक यौगिक हैं जिनमें एंटीऑक्सीडेंट, एंटी-इंफ्लेमेटरी गुण होते हैं। इन गुणों के कारण, पॉलीफेनॉल मोतियाबिंद जैसी एकत्रीकरण प्रवण बीमारी के लिए संभावित दवा के रूप में कार्य कर सकते हैं। इन गुणों के बावजूद, पॉलीफेनॉल में पानी की कम घुलनशीलता और क्षरण और एकत्रीकरण की संभावना जैसी सीमाएँ होती हैं। इन सीमाओं को चिटोस, टी. पी. पी. और पी. एल. जी. ए. जैसे बायोडिग्रेडेबल पॉलिमर से बने एनकैप्सुलेशन सिस्टम द्वारा दूर किया जा सकता है।

इस थीसिस का शीर्षक है "पॉलीफेनॉल-आधारित रणनीतियाँ γ D-क्रिस्टलीन एकत्रीकरण और बेहतर वितरण के लिए उनके एनकैप्सुलेशन को रोकने के लिए"

शोध का उद्देश्य विभिन्न परिस्थितियों में स्थापित γ D-क्रिस्टलीन के एकत्रीकरण को देखना, इसके अवरोध के लिए एक संभावित पॉलीफेनॉल को उजागर करना, उसके बाद बायोडिग्रेडेबल नैनोकणों में पॉलीफेनॉल का कैप्सुलेशन और अंत में मोतियाबिंद जैसी बीमारी के लिए संभावित दवा के रूप में पॉलीफेनॉल से भरे बायोडिग्रेडेबल नैनोकणों का उपयोग करना है। थीसिस को सात अध्यायों में व्यवस्थित किया गया है, जिनमें से प्रत्येक इन उद्देश्यों को संबोधित करता है।

अध्याय 1: यह अध्याय प्रोटीन और प्रोटीन के एकत्रीकरण के कारण होने वाली बीमारियों पर मौजूदा साहित्य की गहन समीक्षा प्रस्तुत करता है। इसके बाद यह मोतियाबिंद पर चर्चा करता है, जिसमें उनके विकास में क्रिस्टलीन प्रोटीन एकत्रीकरण की भूमिका पर विशेष ध्यान दिया जाता है। यह व्यवस्थित रूप से क्रिस्टलीन एकत्रीकरण में योगदान देने वाले विभिन्न कारकों की खोज करता है, जबकि विभिन्न क्रिस्टलीन प्रोटीन प्रकारों की संरचना, स्थिरता और कार्यों सहित आंख के घटकों का विस्तृत अवलोकन प्रदान करता है। इस अध्याय में आगे चिटोस-आधारित नैनोकणों में पॉलीफेनोल्स के आवरण के बारे में चर्चा की गई है।

अंत में, अध्याय γ D-क्रिस्टलीन के एकत्रीकरण के लिए विभिन्न स्थितियों को अनुकूलित करने, γ D-क्रिस्टलीन के एकत्रीकरण के अवरोध के लिए एक संभावित पॉलीफेनॉल की जांच करने और पॉलीफेनॉल से भरे नैनोकणों के निर्माण के उद्देश्य से परिकल्पना और अनुसंधान उद्देश्यों को रेखांकित करके समाप्त होता है। इन जटिल प्रक्रियाओं का अध्ययन किया गया। इस अध्याय के अंत में, वैज्ञानिक समस्या की उत्पत्ति, इस शोध प्रबंध के लिए तैयार किए गए उद्देश्यों और किए गए शोध कार्य की रूपरेखा पर चर्चा की गई।

अध्याय 2: यह अध्याय प्रोटीन अभिव्यक्ति और शुद्धिकरण एकत्रीकरण से संबंधित प्रयोगों के लिए प्राप्त रसायनों का विवरण देता है, अध्ययन में उनकी प्रासंगिकता और अनुप्रयोग पर जोर देता है। यह अनुसंधान में नियोजित प्रयोगात्मक और

कम्प्यूटेशनल तकनीकों के उपयोग के अंतर्निहित सिद्धांतों पर भी चर्चा करता है। इसके अलावा, यह अध्याय किए गए विभिन्न विश्लेषणों के बारे में व्यापक जानकारी प्रदान करता है, जो संभावित दवा खोजने में कार्यप्रणाली और उनके महत्व के बारे में अंतर्दृष्टि प्रदान करता है (polyphenol).

अध्याय 3-7 इस थीसिस में किए गए सभी कार्यों को प्रस्तुत करता है।

अध्याय 3: इस अध्याय में, चिटोस-आधारित नैनोकणों के निर्माण और लक्षण वर्णन पर चर्चा की गई है। नैनोपार्टिकल्स सीएस-टीपीपी एनपी और सीएस-पीएलजीए एनपी के दो सेट बनाए गए थे, और उनका लक्षण वर्णन जैवभौतिकीय तकनीकों जैसे टीईएम, डीएलएस, एसईएम और कुछ अन्य द्वारा किया गया था।

अध्याय 4: वर्तमान कार्य में, हमने γ D-क्रिस्टलीन के एकत्रीकरण पर पॉलीफेनॉल लोडेड नैनो-फॉर्मूलेशन के प्रभाव की गहन जांच की। सबसे पहले, प्रोटीन को असंतृप्त स्थितियों में अनाकार समुच्चय बनाने की अनुमति दी गई थी। इसके बाद प्रोटीन के एकत्रीकरण को रोकने के लिए कई पॉलीफेनोल्स की कोशिश की गई। परीक्षण किए गए पॉलीफेनोल्स में, सबसे प्रभावी पॉलीफेनोल रेसवेराट्रोल और केरसेटिन पाए जाते हैं। चूंकि पॉलीफेनॉल क्षरण के लिए प्रवण होते हैं, इसलिए उन्हें प्रभावी ढंग से कार्य करने के लिए एक परिवेशी स्थिति प्रदान करने के लिए उन्हें चिटोस नैनोकणों में समाहित किया गया था। बाद में पॉलीफेनोल्स की लोडिंग दक्षता और रिलीज कैनेटीक्स का परीक्षण किया गया। अंत में, γ D-क्रिस्टलीन एकत्रीकरण के लिए अवरोधक के रूप में रेसवेराट्रोल/केरसेटिन से भरे चिटोस नैनोपार्टिकल्स की प्रभावकारिता की पुष्टि γ D-क्रिस्टलीन प्रोटीन के स्व-संयोजन से जुड़ी आंखों की बीमारियों के संभावित चिकित्सीय हस्तक्षेप में प्रणाली की शक्ति का प्रदर्शन करने वाले प्रयोगों की एक श्रृंखला में की गई।

अध्याय 5: ओजोन परत की कमी और ग्लोबल वार्मिंग जैसे क्रमिक पर्यावरणीय परिवर्तनों के कारण, मानव आंखें यूवी प्रकाश के संपर्क में आती हैं। यू. वी. प्रकाश के संपर्क में आना मोतियाबिंद का कारण हो सकता है, जो नेत्र रोगों में से एक है जो दृष्टि हानि का कारण बन सकता है। हमारे वर्तमान अध्ययन में, हमने γ D-क्रिस्टलीन के यूवी-प्रेरित एकत्रीकरण के लिए अवरोधकों के रूप में पॉलीफेनोल्स की व्यापक जांच की है। यूवी-सी प्रकाश के संपर्क में आने पर, γ D-क्रिस्टलीन अनाकार समुच्चय के बजाय फाइब्रिल बनाता है। विभिन्न पॉलीफेनोल्स का अवरोधकों के रूप में परीक्षण किया गया, जिनमें से केरसेटिन, बैकालिन और कैफिक एसिड प्रभावी पाए गए। चूंकि पॉलीफेनॉल पानी में अघुलनशील होते हैं, इसलिए उनकी जैव उपलब्धता बढ़ाने के लिए नैनोएनकैप्सुलेशन का प्रयास किया गया। सीएस-टीपीपी और सीएस-पीएलजीए एनकैप्सुलेटिंग सिस्टम पर विचार किया गया क्योंकि वे बायोडिग्रेडेबल नैनो-कैप्सूल बनाते हैं। तीन पॉलीफेनोल्स (केरसेटिन, बैकालिन और कैफिक एसिड) में से केरसेटिन छोटे आकार के नैनोकैरियर बनाता है, जो कॉर्नियल/रेटिना की बाधा को पार करने के लिए आवश्यक है। केरसेटिन नैनोकैरियर्स को एक प्रभावी प्रणाली के रूप में माना जाता था जिसका उपयोग चिकित्सीय अनुप्रयोग के लिए किया जा सकता था। इन नैनोकैरियर्स के लिए, कैप्सुलेशन दक्षता और पॉलीफेनॉल रिलीज कैनेटीक्स का अध्ययन किया गया था। सीएस-पीएलजीए एनपी में सीएस-टीपीपी एनपी की तुलना में केरसेटिन के लिए बेहतर लोडिंग दक्षता पाई गई।

अध्याय 6: यह पाया गया है कि मोतियाबिंद लेंस में, स्वस्थ लेंस की तुलना में तांबे जैसी धातु की सांद्रता में काफी वृद्धि होती है। γ -D क्रिस्टलीन लेंस के मूल में अधिक प्रचुर मात्रा में पाए जाने वाले प्रोटीनों में से एक है। प्रायोगिक रूप से, यह पाया गया है कि $\text{Cu} + 2$ जैसे धातु आयन γ -D क्रिस्टलीन के गैर-अमाइलॉइड एकत्रीकरण का कारण बनते हैं। टर्बिडिटी परख, सीडी स्पेक्ट्रोस्कोपी, एएनएस बाइंडिंग अध्ययन और टीईएम जैसे सूक्ष्म अध्ययनों जैसी तकनीकों का उपयोग करके, हम यहां दिखाते हैं कि $\text{Cu} + 2$ गैर-अमाइलॉइड समुच्चय बनाता है। केरसेटिन जैसे पॉलीफेनोल्स, इन धातु-आधारित समुच्चयों के लिए संभावित अवरोधक के रूप में कार्य कर सकते हैं। हालांकि, पॉलीफेनोल्स समस्या से जुड़े होते हैं, यानी पानी में कम घुलनशीलता और स्थिरता। इस कमी को दूर करने के लिए, केरसेटिन से भरे नैनो वाहकों को अवरोधक के रूप में कार्य करने के लिए नियोजित किया गया था।

अंत में, अध्याय 7, भविष्य के पहलू और निष्कर्ष,

इस अध्याय में इस शोध प्रबंध के दौरान किए गए शोध के भविष्य के पहलुओं और निष्कर्षों पर संक्षेप में चर्चा की गई है।

CONTENTS

CERTIFICATE	I
ACKNOWLEDGEMENTS.....	III
ABSTRACT... ..	IV
CONTENTS.....	XI
LIST OF FIGURES.....	XVII
LIST OF TABLES.....	XXII
ABBREVIATIONS	XXIII

Chapter 1

1.1 Introduction.....	2
1.2 Protein folding, misfolding and aggregation.....	4
1.3 Protein folding versus aggregation.....	6
1.4 Factors affecting folding and aggregation.....	6
1.5 Fibrils and Amorphous aggregates	8
1.6 Aggregation leading to Ocular disease.....	10
1.7 Introduction of Cataract	10
1.8 Introduction to the eye and eye lens.....	11
1.9 Types of cataracts	14
1.10 Other types of cataracts	16
1.11 Implications of crystallin proteins in cataract.....	16
1.12 Cause of Cataract	20
1.13 Epidemiology of the disease.....	20
1.14 Available treatment and prevention of disease	20

1.15	Polyphenol based therapy.....	21
1.16	What is nanomedicine?.....	24
1.17	Bio-degradable nanocarriers.....	26
1.18	Polysaccharides as encapsulation biomaterials	27
1.19	Methods for fabrication of nanoparticles.....	32
1.20	Research problem statement.....	33
1.21	Scope of the thesis.....	34
1.22	References	38
Chapter 2		
2.1	Introduction... ..	53
2.2	Chemicals	53
2.2.1	Expression and purification of γ D-crystallin.....	53
2.2.2	Optimization of kinetic condition.....	53
2.2.3	Fabrication of Nanoparticles (i) CS-TPP NPs; (ii) CS-PLGA NPs.....	54
2.2.4	Characterization of nanoparticles	54
2.3	Methods.....	54
2.3.1	Over expression and purification of γ D-crystallin	54
2.3.2	Column chromatography	55
2.3.3	SDS -PAGE (Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis).....	56
2.3.4	Circular dichroism (CD) spectroscopy	56
2.3.5	UV-Visible spectroscopy.....	57
2.3.6	Fluorescence spectroscopy	58
2.3.7	Turbidity Assay	59
2.3.8	Fabrication of nanoparticles	59

Preparation of Chitosan Nanoparticles (CS-TPP) using ionic gelation method.....	60
Preparation of Chitosan coated PLGA (CS-PLGA) nanoparticles using standard emulsion solvent evaporation method.....	61
2.3.9 Dynamic light scattering (DLS)	62
2.3.10 Transmission electron microscopy (TEM)	62
2.3.11 Scanning electron microscopy (SEM)	63
2.3.12 Fourier Transform Infrared, FTIR	63
2.3.13 Reverse phase -high pressure liquid chromatography (RP-HPLC).....	64
2.3.14 Encapsulation efficiency	65
CS-TPP nanoparticles.....	65
CS-PLGA nanoparticles	65
2.3.15 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl hydrate (DPPH) Assay	65
2.3.16 Reducing Assay	66
2.3.17 Docking Analysis	67
2.3.18 References	68

Chapter 3

3.1 Introduction... ..	73
3.2 Material and Methods.....	75
3.2.1 Dynamic light scattering (DLS)	75
3.2.2 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)	75
3.2.3 Transmission electron microscopy (TEM)	76
3.2.4 Scanning electron microscopy of nanoparticles (SEM)	76
3.2.5 DPPH Assay.....	76
3.2.6 Reducing Assay	77
3.2.7 Encapsulation Efficiency.....	77

Polyphenol loaded CS-TPP NPs	77
Polyphenol loaded CS-PLGA NPs	78
3.2.8 Release Kinetics.....	78
3.3 Result and discussion	79
CS-TPP NPs	79
3.3.1 Analysis of size distribution by DLS.....	79
3.3.2 FTIR Spectroscopy.....	81
3.3.3 Transmission electron microscopy (TEM).....	85
3.3.4 Scanning electron microscopy (SEM).....	85
3.3.5 DPPH Assay	86
3.3.6 Reducing Assay	87
3.3.7 Encapsulation Efficiency (EE).....	88
3.3.8 Release of polyphenol from NPs.....	89
CS-PLGA NPs.....	91
3.3.9 DLS and TEM	91
3.3.10 Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)	94
3.3.11 Encapsulation Efficiency (EE).....	96
3.3.12 DPPH Assay.....	96
3.3.13 Release Assay	96
3.4 Conclusion.....	99
3.5 References	100
Chapter 4	
4.1 Introduction... ..	104
4.2 Materials and Methods	108
4.2.1 Overexpression and purification of human γ D-crystallin protein	108

4.2.2 Preparation of chitosan based biodegradable NPs.....	108
Preparation of polyphenol loaded and unloaded CS-TPP NPs	108
Preparation of chitosan loaded and unloaded PLGA NPs.....	108
4.2.3 Characterization of chitosan-based NPs.....	108
4.2.4 Chemical and denaturation studies.....	109
4.2.5 Aggregation studies with polyphenol loaded chitosan nano particles.....	110
4.2.6 Transmission electron microscopy (TEM) for aggregates of protein.....	110
4.3 Result	110
4.3.1 Chemical and thermal denaturation studies.....	110
4.3.2 Aggregation of γ D-crystallin	111
4.3.3 Polyphenol loaded CS-TPP NPs prevent aggregation of γ D-crystallin.....	112
4.3.4 Transmission electron microscopy (TEM) of γ D-crystallin in the presence or absence of polyphenol loaded CS-TPP NPs.....	113
4.4 Conclusion.....	114
4.5 References	120
Chapter 5	
5.1 Introduction... ..	126
5.2 Materials and Methodology.....	129
5.2.1 Overexpression and purification of γ D-crystallin	129
5.2.2 Preparation of chitosan based biodegradable NPs.....	129
Preparation of polyphenol loaded and unloaded CS-TPP NPs	129
Preparation of chitosan loaded and unloaded PLGA NPs.....	129
5.2.3 Characterization of chitosan-based NPs.....	130
5.2.4 Aggregation kinetics.....	130
5.2.5 Aggregation kinetics in the presence of polyphenols.....	131
5.2.6 Transmission electron microscopy (TEM) for aggregates of γ D-crystallin.....	132

5.3 Results and discussions	132
5.4 Conclusion.....	141
5.5 References	142
Chapter 6	
6.1 Introduction... ..	147
6.2 Material and Methods.....	151
6.2.1 Overexpression and Purification of the Human γ D- Crystallin Protein... ..	152
6.2.2 Preparation of chitosan based biodegradable NPs.....	152
Preparation of polyphenol loaded and unloaded CS-TPP NPs... ..	152
Preparation of chitosan loaded and unloaded PLGA NPs... ..	152
6.2.3 Characterization of chitosan-based NPs... ..	152
6.2.4 Optimization of Kinetics	152
6.2.5 Docking analysis	154
6.3 Results and Discussions	154
6.4 Conclusion.....	164
6.5 References	165
Chapter 7	
Summary and Future Plan	170
Curriculum Vitae	173

LIST OF FIGURES

Figure No.	Figure Title	Page No.
Chapter 1		
Figure 1.1	Pictorial representation showing folding of protein using hydrophobic effect.....	6
Figure 1.2	Visual representation showing eye anatomy.....	11
Figure 1.3	Pictographic introduction to cataract.	
(A)	In the case of normal vision, light enters the eye and focused on the retina by a clear lens.	
(B)	In the case of cataract, accumulation of protein aggregates in lens leads to blurred vision.	12
Figure 1.4	Schematics of a cross-section of lens tissue. Presence of cell organelles in the lens fiber cells may lead to scattering of incident light and poor vision. Therefore, lens fiber cells remove all cell organelles as it undergoes development from differentiating lens fiber to mature lens fiber cell.....	14
Figure 1.5	Structures of α A- and α B-crystallin:	
(A)	Structure of α A-crystallin (PDB 3L1F) determined by X-ray crystallography,	
(B)	and α B-crystallin (PDB 2KLR) by Solid-state NMR	
	(for clarity only single chain of α B is shown)	17
Figure 1.6	Chaperon activity of α B-crystallin protein	17
Figure 1.7	Amino acid sequence of human γ C, γ D and γ S crystallin proteins.....	18
Figure 1.8	Structure of a human γ D-crystallin protein and various amino acid interactions...	19
Figure 1.9	Polyphenols are classified into two groups, flavonoids and non-flavonoids	22
Figure 1.10	Scheme of polyphenols associated drawbacks and nano-encapsulation to overtake it	23
Figure 1.11	Schematic diagram showing various nanocarriers	24
Figure 1.12	Diagram showing various eye barriers.....	25
Figure 1.13	Structure of chitosan... ..	28
Figure 1.14	Various application of chitosan NPs for drug delivery through various routes....	29

Figure 1.15 A. Advantage of chitosan based nanocarriers, B. Mucoadhesive character of chitosan	30
Figure 1.16 Structure of PLGA and degradation of PLGA	31
Figure 1.17 Interaction between chitosan and TPP in ionic gelation method... ..	32
Figure 1.18 Diagram showing various ways for preparation of Chitosan nanoparticles	33

Chapter 2

Figure 2.1. Purification and characterization of γ D-crystallin A.(i) SDS-Page of γ D-crystallin (ii) SEC trace of purified γ D-crystallin, B. DLS spectrogram of γ D-crystallin, C. CD spectrum of γ D-crystallin, D. thermal melting study of γ D-crystallin, E. Fluorescence spectrum of γ D-crystallin	58
Figure 2.2: Schematic representation showing fabrication of CS-TPP NPs	60
Figure 2.3: Schematic representation for fabrication of CS-PLGA NPs.....	62
Figure 2.4: Structure of DPPH and its change in presence of polyphenol	66
Figure 2.5: Chemical reaction involved in reducing assay	67

Chapter 3

Figure 3.1: The DLS profile for CS-TPP NPs at various ratios A. 3:1, B. 4:1, C.5:1... ..	79
Figure 3.2: The DLS profile of CS-TPP nanoparticles (3:1) loaded with different polyphenols, including quercetin, resveratrol, baicalein, and caffeic acid	81
Figure 3.3 FTIR Spectrogram for A. CS, TPP and CS-TPP NPs; B.i Free quercetin and quercetin loaded CS-TPP NPs; B.ii Free quercetin and quercetin loaded CS-TPP NPs between 2000-500 cm^{-1} ; C Free resveratrol and resveratrol loaded CS-TPP NPs	82
Figure 3.4: TEM micrographs for A.CS-TPP NP; B. Quercetin CS-TPP NP; C. Resveratrol CS-TPP NP.....	85
Figure 3.5: SEM micrographs D.i Free chitosan; D.ii CS-TPP NP; E. Quercetin CS-TPP NP; F. Resveratrol CS-TPP NP	86
Figure 3.6: Scavenging effect of polyphenol loaded CS-TPP NPs using 1,1 diphenyl -2-picryl-hydrazyl radical (DPPH); A.i Quercetin CS-TPP NP; A.ii Resveratrol CS-TPP NP, A.iii A comparative analysis of scavenging properties of resveratrol and quercetin CS-TPP NPs with control CS-TPP NP; Each value is expressed as mean percentage $\pm$ SD (n=3)	87
Figure 3.7 Reducing power of polyphenol loaded CS-TPP NP, A.i Quercetin CS-TPP NP, A.ii Resveratrol CS-TPP NP, A.iii A comparative analysis of reducing power of resveratrol and	

quercetin CS-TPP NPs with control CS-TPP NP; Each value is expressed as mean $\pm$ SD (n=3).....	88
Figure 3.8: The UV-Visible spectrum over time for quercetin-loaded CS-TPP nanoparticles and resveratrol-loaded CS-TPP nanoparticles	89
Figure 3.9: The amount of quercetin released from quercetin CS-TPP NP is evaluated over time using RP-HPLC. The quercetin concentration is plotted in terms of both weight and molarity	90
Figure 3.10: The absorbance of quercetin was monitored at 376 nm over time: A.i represents quercetin release from quercetin-loaded CS-TPP nanoparticles, and A.ii shows free quercetin.....	90
Figure 3.11: Characterization of CS-PLGA NP using DLS spectrogram and TEM image....	91
Figure 3.12: The impact of organic solvent on the fabrication of CS-PLGA nanoparticles was analyzed using the DLS technique	91
Figure 3.13: The effect of temperature on the fabrication of CS-PLGA nanoparticles was investigated using the DLS technique.....	92
Figure 3.14: DLS spectrogram for polyphenol loaded CS-PLGA NPs. Polyphenol used are quercetin, baicalein and caffeic acid	92
Figure 3.15: TEM image of A. CS-PLGA in liquid form; B. CS-PLGA NPs after dry- freezing	93
Figure 3.16: Effect of cryoprotectant (glucose) on CS-PLGA NPs using DLS and TEM	93
Figure 3.17: FTIR spectrogram A.i CS-PLGA NPs, CS, PLGA NPs; A.ii Quercetin CS-PLGA nanoparticles and free quercetin.....	94
Figure 3.18: Scavenging effect for quercetin CS-PLGA NPs was studied using DPPH assay	96
Figure 3.19: Quercetin exhibits a maximum absorbance at 376 nm. The absorbance at 376 nm is measured over time: A.i shows quercetin released from quercetin-loaded CS-PLGA nanoparticles, and A.ii represents free quercetin.....	97
Figure 3.20: Mass spectrogram for free quercetin.....	98
Figure 3.21: Mass spectrogram for quercetin from quercetin CS-PLGANPs.....	98
Figure 3.22: Mass spectrogram for quercetin released from quercetin CS-PLGA NPs after 30 minutes	99
Figure 4.1: Denaturation study of human γ D-crystallin A. Thermal denaturation of γ D-crystallin using ANS fluorescence B. Chemical denaturation study of γ D-crystallin with GdmCl using fluorescence spectroscopy C.) Thermal denaturation of γ D-crystallin using Trp fluorescence in the absence (blue trace) and presence of 1 M GdmCl (orange trace) D. Thermal melting of γ D-crystallin using CD spectroscopy in the absence (red trace) and presence (black trace) of 1 M GdmCl E. Aggregation kinetics of γ D-crystallin at 45 °C observed at 320 nm in	

the presence of different concentrations of GdmCl F. UV spectroscopic (at 320 nm) analysis of aggregates of γ D-crystallin using various polyphenols..... 111

Figure 4.2: A. Aggregation kinetics in the presence of polyphenol (quercetin and resveratrol) loaded chitosan TPP nanoparticles using turbidity assay, B. Kinetic study with quercetin and quercetin loaded CS-TPP NPs (6 hours post incubation) 113

Figure 4.3: Transmission electron microscopy (TEM) images of A.i aggregates of γ D-crystallin in presence of 1M GdmCl, A.ii Zoomed-in-view of aggregates B. TEM images of absence of aggregates of γ D-crystallin in presence of (i) free quercetin (ii) free resveratrol C. TEM images of absence of aggregates of γ D-crystallin in the presence of polyphenol loaded CS-TPP NPs (i) Quercetin (ii) Resveratrol 114

Figure 4.4: Docking result for γ D-crystallin with quercetin and resveratrol A. Bar graph showing aggregation prone regions predicted by AGGRESCAN. B. LigPlot analysis of interaction between (i) γ D-crystallin and quercetin (ii) γ D-crystallin and resveratrol, C. Chimera (a software used for interactive visualization) it visualize interaction between γ D-crystallin and (i) quercetin (ii) resveratrol in surface and ribbon representation of protein respectively..... 116

Figure 5.1: Kinetics of γ D-crystallin aggregation on irradiation with UV-C light studies through A. Turbidity assay for γ D-crystallin at different concentrations (10 μ M, 20 μ M and 30 μ M) B. ThT assay for 20 μ M γ D-crystallin C. ANS fluorescence of 20 μ M γ D-crystallin D. CD spectroscopy for γ D-crystallin at 20 μ M..... 134

Figure 5.2: FTIR Spectra for γ -D crystallin (i) Fibrils (ii) Native protein 134

Figure 5.3: Kinetics of UV-induced γ -D crystallin aggregation A. Turbidity assay of γ -D crystallin samples in presence of polyphenols (polyphenols used are EGCG, resveratrol, quercetin, caffeic acid and baicalein). γ -D crystallin sample without polyphenol is used as control, B. ThT assay of samples in the presence of polyphenols (Caffeic acid, baicalein and quercetin)..... 136

Figure 5.4: Turbidity assay of γ D-crystallin in presence of UV-C light A. with quercetin loaded CS-TPP NPs, B. with quercetin loaded CS-PLGA NPs 137

Figure 5.5: ThT Assay of samples in presence of empty CS PLGA NPs sand quercetin CS PLGA NPs..... 137

Figure 5.6: Samples of γ D-crystallin on the exposure of UV-C light A. alone (fibrils formation) B. with quercetin C. with quercetin loaded CS-TPP NPs D. with quercetin loaded CS-PLGA NPs 139

Figure 5.7: A. “Hot spots” or aggregation prone site predicted by Aggrescan , B. Docking studies between γ D-crystallin and quercetin 140

Figure 6.1: A. Turbidity assay (absorbance at 404 nm) in presence of different concentration of copper sulphate B. TEM micrographs in presence of 5 equivalent copper sulphate and γ D-crystallin. Denaturation study of γ D- crystallin C. With 5 equivalent copper sulphate using ANS fluorescence D. Change in ellipticity of protein sample with 5 equivalent copper sulphate at different time interval, 0 minutes (blue trace) and 30 minutes (black trace) 155

Figure 6.2: ThT Assay for γ -D crystallin in presence of Cu^{+2} 156

Figure 6.3: SDS gel image of A. γ D- crystallin B. Aggregates of γ D- crystallin in presence of Cu (II) (S, Supernatant; P, Pellet)	157
Figure 6.4: Turbidity assay (absorbance at 404 nm) of the formation of aggregates of γ D- crystallin alone and in presence of different polyphenols (quercetin, baicalein and resveratrol). Protein without polyphenol and Cu (II) is taken as control.....	158
Figure 6.5: Turbidity (absorbance at 404 nm) due to aggregation of crystallin in presence of quercetin when it is introduced after 30 minutes.....	159
Figure 6.6: Turbidity assay (absorbance at 404 nm) in presence of quercetin loaded CS-TPP and quercetin loaded CS-PLGA NPs (upper panel). TEM micrographs with 5 equivalent copper sulphate in presence of quercetin loaded CS-TPP and quercetin loaded CS-PLGA NPs (lower panel).....	160
Figure 6.7: Aggrescan plot for γ -D crystallin.....	161
Figure 6.8: Interaction between Cu (II) & γ D- crystallin obtained using MIB2: Metal Ion-Binding site prediction and modeling server.....	162
Figure 6.9: Plot showing docking study of quercetin and γ D-crystallin	163

LIST OF TABLES

Table no	Table Title	Page No.
Table 1.1	Shows various diseases caused by aggregation of protein...	9
Table 3.1	Summarizes the particle size (diameter in nm) and PDI for different CS: TPP ratio	80
Table 3.2:	Spectral peaks of chitosan in FTIR spectrum.....	82
Table 3.3:	Spectral peaks of TPP in FTIR spectrum.....	83
Table 3.4:	Spectral peaks of Chitosan-TPP nanoparticle (CS-TPP NP) in FTIR spectrum...	83
Table 3.5:	Spectral peaks of quercetin in FTIR spectrum	84
Table 3.6:	Spectral peaks of quercetin loaded CS-TPP NPs in FTIR spectrum	84
Table 3.7:	Spectral peaks of resveratrol in FTIR spectrum	84
Table 3.8:	Spectral peaks of resveratrol loaded CS-TPP NPs in FTIR spectrum.....	85
Table 3.9:	FTIR peaks for quercetin-loaded and unloaded CS-TPP NPs and quercetin-loaded and unloaded CS-PLGA NPs	95

ABBREVIATIONS

mM	millimolar
mL	millilitre
min	minutes
Sec	seconds
DLS	Dynamic Light Scattering
FTIR	Fourier-Transform Infrared
TEM	Transmission electron microscopy
SEM	Scanning electron microscopy
UV	Ultra-Violet
CD	Circular Dichroism
SEC	Size exclusion chromatography
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetic acid
RP-HPLC	Reverse Phase High Pressure Liquid Chromatography
PDB	Protein Data Bank
ANS	8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid

ThT	ThioFlavin T
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
CS	Chitosan
TPP	Triphosphate
PLGA	Poly(lactic-co-glycolic acid)
NPs	Nanoparticles