



Циклический ингибитор трипсина из семян подсолнечника SFTI-1: структура, практическое применение и возможное происхождение

Ал.В. Конарев^{1,2}

¹Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Россия, 196608, Санкт-Петербург, Пушкин, ш. Подбельского, д. 3

²Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И.Вавилова (ВИР), Россия, 190000, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, 44
E-mail: alv-konarev@yandex.ru

Резюме

Протеазы вовлечены в важнейшие процессы, протекающие в живых организмах. В регуляции их активности участвуют белковые ингибиторы протеаз (ИП). ИП являются важным элементом иммунной системы растений и представляют интерес для медицины как средство подавления нежелательной активности протеаз. На основе природных ИП методами биотехнологии создаются формы с заданными свойствами. Уникальный циклический ингибитор трипсина (ИТ) из семян видов рода *Helianthus* L. (подсолнечник) - SFTI-1 найден в результате скрининга коллекции Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР). Он отличается малым размером (1513 Да), простотой структуры и относительной легкостью ее модификации, чрезвычайно высокой стабильностью, способностью проникать через мембраны клеток и т.п. В мире опубликованы сотни работ по SFTI-1, посвященных конструированию его новых форм, специфичных к протеазам человека и микроорганизмов, вовлеченным в патологические процессы. Производные SFTI-1 могут быть использованы и для защиты растений от вредителей и болезней. Остается до конца невыясненным вопрос о происхождении SFTI-1, практически сходного по структуре с ингибиторной петлей ингибитора Bowman-Birk (BBI) из сои, но замкнутого в кольцо. Остальные участки молекулы, характерные для BBI, у него отсутствуют. SFTI-1 синтезируется в единой полипептидной цепи вместе с одним из 2S альбуминов и найден только у подсолнечника и представителей ближайших родов. Сходные с SFTI-1 низкомолекулярные ИТ (HV-BBI) обнаружены в коже амфибий. Преобладает мнение о конвергентном независимом происхождении BBI, HV-BBI и SFTI-1. Единственная пока гипотеза о происхождении SFTI-1 состоит в том, что десятки миллионов лет назад в гене запасного 2S альбумина между участками, кодирующими сигнальный пептид и малую субъединицу белка, возникла дополнительная последовательность, кодирующая небольшой пептид, который в ходе эволюции превратился в SFTI-1. То есть по этой гипотезе мощный и высокоспециализированный ИТ сформировался у подсолнечника за относительно короткое время благодаря преобразованию практически случайной нуклеотидной последовательности. В обзоре рассматриваются и другие возможные варианты возникновения SFTI-1. Анализ баз данных выявил гомологию последовательностей ДНК, кодирующих SFTI-1 и HV-BBI с фрагментами последовательностей ИП семейства Казала. Последние широко распространены как у животных, так и у оомицетов и растений, в т.ч., паразитических, что позволяет предположить связь генов данных ингибиторов с происхождением SFTI-1.

Ключевые слова: подсолнечник, протеаза, 2S альбумин, ингибитор трипсина, SFTI-1, ингибитор Баумана-Бирк, BBI, ингибитор Казала.

Цитирование: Конарев Ал.В. Циклический ингибитор трипсина из семян подсолнечника SFTI-1: структура, практическое применение и возможное происхождение. *Biomcs*. 2026. Т.18(1). С.23-45. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2026-3

© Автор, Ал.В. Конарев, 2026

Sunflower seed cyclic trypsin inhibitor SFTI-1: structure, practical applications and possible origin

Al.V. Konarev^{1,2}

¹All-Russian Institute of Plant Protection (VIZR),
3, Podbelskogo Highway, Pushkin, St. Petersburg, 196608 Russia
²N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR),
42, 44, Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg, 190000 Russia
E-mail: alv-konarev@yandex.ru

Resume

Proteases are involved in vital processes occurring in living organisms. Proteinaceous inhibitors participate in the regulation of protease activity. Protease inhibitors (PIs) are an important element of the plant immune system and are of interest to medicine as a means of suppressing unwanted protease activity. Biotechnology methods are used to create forms with specified properties based on natural PIs. A unique cyclic trypsin inhibitor (TI) from the seeds of species of the genus *Helianthus* L. (sunflower) - SFTI-1 - was found as a result of screening N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR) seed collection. It is distinguished by its small size (1513 Da), simple structure and relative ease of modification, extremely high stability, ability to penetrate cell membranes, etc. Hundreds of papers on SFTI-1 have been published worldwide, devoted to the design of its new forms specific to human and microbial proteases involved in pathological processes. SFTI-1 derivatives can also be used to protect plants from pests and diseases. The origin of SFTI-1 remains unclear. SFTI-1 is almost identical in structure to the inhibitory loop of the Bowman-Birk protease inhibitor (BBI) from soybeans, but is closed in a ring. The other parts of the molecule that are characteristic of BBI are absent. SFTI-1 is synthesized in a single polypeptide chain with one of the 2S albumins and is found only in sunflower and representatives of the closest genera. Low-molecular-weight TIs (HV-BBIs) similar to SFTI-1 have been found in the skin of amphibians. The prevailing opinion is that BBI, HV-BBI, and SFTI-1 have convergent independent origins. The only hypothesis about the origin of SFTI-1 so far is that tens of millions of years ago, in the gene for the reserve 2S albumin, between the regions encoding the signal peptide and the small subunit of albumin, an additional sequence arose that encoded a small peptide, which evolved into SFTI-1. According to this hypothesis, a powerful and highly specialized TI was formed in sunflower in a relatively short time due to the transformation of a virtually random nucleotide sequence. The review also considers other possible scenarios for the emergence of SFTI-1. Analysis of databases revealed homology between the DNA sequences encoding SFTI-1, HV-BBI and fragments of the sequences of Kasal family PIs. The latter are widespread in animals, plants, and oomycetes, including parasitic ones, suggesting a link between the genes of these inhibitors and the origin of SFTI-1.

Key words: sunflower, protease, 2S albumin, trypsin inhibitor, SFTI-1, Bowman-Birk inhibitor, BBI, Kasal inhibitor.

Citation: Konarev Al.V. Sunflower seed cyclic trypsin inhibitor SFTI-1: structure, practical applications and possible origin. *Biomcs*. 2026. V.18(1). P.23-45. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2026-3 (In Russian)

© Author, Al.V. Konarev, 2026

Введение

Протеазы входят в число ключевых ферментов всех живых организмов. Они участвуют практически во всех важнейших физиологических

процессах, протекающих в животных, растениях, грибах и бактериях от пищеварения до защитных реакций и процессинга белков [López-Otín, Bond, 2008]. От двух до четырех процентов генов

большинства организмов кодируют протеазы. Особое место занимают сериновые протеазы, составляющие, например, у человека около 30 процентов всех протеаз (наиболее известные представители трипсин или химотрипсин) и отвечающие за расщепление белков пищи, свертывание крови, активацию проферментов, процессинг синтезируемых на рибосомах полипептидов и многое другое [Di Cera 2009; Wei et al., 2024; Aporva et al., 2025]. Деструктивная активность чужеродных протеаз насекомых и грибов требует ограничения для обеспечения иммунитета растений, а несвоевременная активация эндогенных протеаз в семенах и других запасающих органах растений наносит существенный урон сельскому хозяйству [Конарев (Konarev), 2017; Divekar et al., 2023]. Многие патологии человека (чрезмерное воспаление, аутоиммунные реакции, онкологии, риск тромбозов и т.д.) так или иначе связаны с нарушениями в активности протеаз, преимущественно с ее повышением [Aporva et al., 2025; Deraison, Vergnolle, 2026]. Потенциально опасная для собственных белков организма активность как эндогенных, так и экзогенных протеаз ограничивается эндогенными ингибиторами протеаз (ИП). ИП, как и сами протеазы, есть у всех эукариот и представлены множеством форм, существенно отличающихся по размеру, структуре, специфичности и функциям, включающим регуляцию эндогенных и подавление чужеродных протеаз [Richardson et al., 1991; Mosolov, Valueva, 2005; Wei et al., 2024]. Нарушение баланса между активностью эндогенных протеаз и их ингибиторов приводит к различным патологиям, а недостаточная активность ИП к чужеродным протеазам приводит к снижению иммунитета как растений, так и человека и животных. С практической точки зрения у растений ИП интересны, в первую очередь, как факторы, защищающие запасные и структурные белки от гидролиза ферментами фитофагов и как ограничители их преждевременного гидролиза эндогенными ферментами [Конарев (Konarev), 2017; Clemente et al., 2019]. В медицине ИП рассматриваются как перспективные терапевтические средства, позволяющие поддерживать тонкое равновесие в системах коагуляции крови, ограничивать воспалительные процессы, ускорять заживление ран, управлять апоптозом, подавлять развитие вирусов и т.д. [Leung et al., 2000, Srikanth, Chen, 2016]. Высокополиморфные ИП представляют также интерес в качестве молекулярных маркеров для при решении проблем систематики, филогении и сортовой идентификации растений [Kaiser et al., 1974; Конарев (Konarev), 2000c; Konarev et al., 2002b].

Известно, что отдельные типы ингибиторов протеаз, в частности, родственные ингибитору

трипсина и химотрипсина Баумана-Бирк (Bowman-Birk) из семян сои (ВВІ), поступающие с растительной пищей, обладают антиканцерогенной, радиопротекторной и другими активностями и способны оказывать благоприятное воздействие на организм человека [Kennedy, 1998; Shea et al., 2024; Hashemzaei et al., 2025]. Подобные ингибиторы были найдены в семенах бобовых и злаков. ВВІ способны преодолевать стенки кишечника и достигать внутренних органов, что делает обоснованной разработку подходов к использованию данных ИП для профилактики и лечения широкого круга заболеваний. ВВІ, как и другие ингибиторы протеаз, чрезвычайно разнообразны, и новые перспективные исходные формы могут быть найдены как при анализе генофонда культурных растений, так и у других организмов.

В последние годы растет количество работ по конструированию методами биотехнологии специфичных ингибиторов определенных протеаз на основе природных форм. В основе механизма действия многих ИП лежит имитация ими природных субстратов протеаз. Отличие от субстратов заключается в том, что связавшийся с активным центром протеазы ингибитор так и остается в этом положении, блокируя ее активность. Специфичность ингибитора к протеазе определяется последовательностью аминокислотных остатков в реактивном центре. Замены отдельных аминокислотных остатков могут существенно влиять на специфичность ИП, что и лежит в основе подходов к конструированию их новых форм. В связи с этим особенно актуальной задачей является поиск небольших и относительно простых по структуре форм ИП, пригодных для конструирования на их основе новых белков с заданными свойствами и биологической активностью. Ярким представителем таких ИП является циклический ингибитор трипсина из подсолнечника SFTI-1 - самый низкомолекулярный и мощный ингибитор трипсина из всех белковых ингибиторов, найденных у растений [Luckett et al., 1999, Korsinczky et al., 2001].

История открытия

С 70-х годов прошлого века в Лаборатории иммунитета растений к вредителям (ныне Лаборатория сельскохозяйственной энтомологии) Всесоюзного/Всероссийского института защиты растений (ВИЗР) и Отделе биохимии и молекулярной биологии ВИР (ныне Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова) проводились совместные исследования белков семян злаков и других растений – ингибиторов α -амилаз (ИАм) и протеаз (ИП) в связи с вопросами

устойчивости растений к вредителям и болезням, а также эволюции и систематики растений [Konarev, 1978; Конарев (Konarev) 1982]. Было показано, в частности, что состав ИАм и ИП отражает филогению полиплоидных пшениц и их коэволюцию с насекомыми [Konarev, 1996a, 2000b], филогению некоторых групп бобовых [Konarev et al., 2002b], а также может быть использован, например, в сортовой идентификации пшениц [Konarev (Konarev), 1987; 2000c; Konarev, 1996b]. Кроме того, среди белков семян представителей различных таксонов растений проводился целенаправленный поиск низкомолекулярных форм ИП, представляющих интерес как основы для создания новых ингибиторов, которые могли бы быть использованы в защите растений от вредных насекомых и микроорганизмов или в медицине. До конца 1990-х было принято считать, что молекулярные массы белковых ИП из растений находятся в диапазоне от 5-8 до 60-80 кДа [Ryan, 1990; Srikanth, Chen, 2016; Shamsi et al., 2016]. Наиболее изученными были ИП злаков, картофеля и бобовых [Mosolov, Valueva, 2005], тогда как большинство таксонов, например, Compositae (Сложноцветные) или более обширной группы Asteridae (за исключением пасленовых) оставались практически неисследованными в отношении ИП. В литературе не было сведений об ИП семян такой важной культуры как подсолнечник, которая, помимо масла, является ценным источником белка [González-Pérez 2015 ; Pitera, Pitera, 2025]. Методами изoeлектрического фокусирования и тонкослойной гель-фильтрации в сочетании с методом желатиновых реплик [Конарев (Konarev), 1986; Конарев, Фомичева (Konarev, Fomicheva) 1991; Konarev, Lovegrove, 2012] был проведен скрининг белков семян сотен культурных и диких видов сложноцветных и других Asteridae из коллекций ВИР и Ботанического института им. В.Л. Комарова Российской академии наук. Это позволило охарактеризовать многие таксоны по ИП, содержащимся в семенах и найти ряд новых форм ИП, в том числе низкомолекулярных, например, VhTI из семян вероники *Veronica hederifolia* L. [Konarev et al., 1999a, 2000a, 2002a, 2004]. Особенно детально были изучены представители рода *Helianthus* L. (подсолнечник). В результате скрининга в семенах разных видов подсолнечника были идентифицированы ингибиторы трипсина/субтилизина (ИТ/Ст) с изоточками в интервале рН от 6 до 8 и очень активный ингибитор трипсина (ИТ) с изоточкой выше 10 [Конарев (Konarev), 1995, Konarev et al., 1998, 1999a, 2000a].

Исследования данных ингибиторов были продолжены в сотрудничестве с лабораторией проф. P.Shewry в Лонг-Эштонской исследовательской станции в Великобритании (Long Ashton Research

Station, UK). Рентгеноструктурный анализ VhTI из семян вероники показал, что он принадлежит к новому семейству ингибиторов трипсина и антимикробных пептидов с двуспиральной молекулой [Konarev et al., 2004; Connors et al., 2007], позже названному альфа-гарпининами (α -hairpinins) [Orpin et al., 2012].

У подсолнечника и других сложноцветных были выявлены ингибиторы трипсина-субтилизина, которые оказались представителями большого семейства картофельного ингибитора химотрипсина I, характерного для многих таксонов растений, включая Asteridae [Konarev et al., 1999a, 2000a; Konarev et al., 2002a], и проявили способность подавлять протеазы фитопатогенных грибов [Konarev et al., 1999b]. В свою очередь ИТ с первых этапов изучения сразу проявил необычные свойства. Он был очищен аффинной хроматографией на трипсин-сефарозе с последующей обратно-фазовой HPLC. После SDS-электрофореза очищенного препарата ингибитора по Лэмбли [Laemmli, 1970] с общепринятой окраской Кумасси гель оказывался “пустым”. Только “пришивание” белка к полиакриламидному гелю глутаровым альдегидом позволило локализовать ингибитор трипсина в зоне геля, соответствующей приблизительно 1.5 кДа. Белок был настолько мал, что легко вымывался из геля при обычной фиксации. Об уникальном ингибиторе было доложено на XV конгрессе EUCARPIA в 1998 году в Витербо, Италия [Konarev et al., 1998, 1999a], о чем упоминают в своих работах J.Mylne [2011a] и V.Franke et al. [2018]. Размер пептида, определенный с помощью масс-спектрометрии, составил 1513 Да. Попытка секвенирования по Эдману не дала результата – не удавалось найти N-концевой остаток пептида. Рентгеноструктурный анализ, проведенный в Бристольском университете (University of Bristol), дал неожиданный результат – пептид, названный SFTI-1 (Sunflower Trypsin Inhibitor-1) оказался циклическим [Brady et al., 1999; 2000; Luckett et al., 1999]. Кроме того, SFTI-1 проявил себя как самый низкомолекулярный и мощный ингибитор трипсина из всех белковых ингибиторов, найденных у растений [Luckett et al., 1999, Korsinczky et al., 2001].

Структура

Циклическая структура SFTI-1, первоначально определенная рентгеноструктурным анализом [Luckett et al., 1999], была подтверждена методом ядерного магнитного резонанса (NMR) [Korsinczky et al., 2001]. Было установлено, что пептид замкнут в кольцо. В начале 21-го века столь низкомолекулярные циклические пептидные ингибиторы протеиназ у растений считались уникальным явлением.

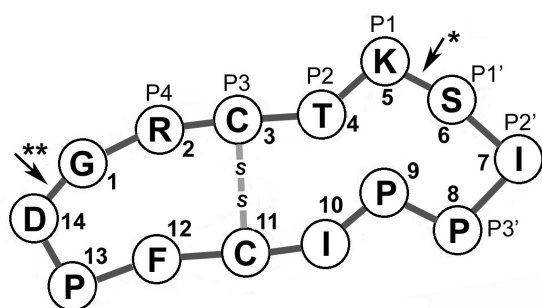


Рис.1. Схематичное изображение структуры ингибитора трипсина из семян подсолнечника SFTI-1. 1-14 - нумерация аминокислотных остатков; P4 - P3' – позиции остатков относительно сайта протеолиза (*); ** – пептидная связь, образованная при циклизации линейного предшественника, S - S – дисульфидная связь [Luckett et al., 1999; Swedberg et al., 2017; de Veer et al., 2021].

Fig. 1. Schematic representation of the structure of the sunflower seed trypsin inhibitor SFTI-1. 1-14, amino acid residue numbering; P4 - P3', residue positions relative to the proteolysis site (*); **, peptide bond formed by cyclization of the linear precursor, S - S – disulfide bond [Luckett et al., 1999; Swedberg et al., 2017; de Veer, et al., 2021].

Стабилизированный замкнутыми N- и C-концами пептид состоит из 14 аминокислотных остатков, формирующих две антипараллельные β -структуры, "стянутые" дисульфидной связью. Дополнительную жесткость данной структуре придают внутренние водородные связи. Все это обеспечивает пептиду чрезвычайно высокую стабильность и сохранение активности, в частности, даже после протеолитического гидролиза сайта P1-P1' [Riley et al., 2019].

SFTI-1 оказался представителем обширной, но пока малоизученной у растений группы циклических пептидов, проявляющих широкий спектр биологических активностей, в частности, в отношении микроорганизмов, животных и человека [Craik et al., 2018; Shirsat et al., 2025]. В свою очередь, циклические пептиды грибов, бактерий и животных уже используются в терапии различных заболеваний человека [Falanga et al., 2017; Abdalla, McGaw, 2018; Helmu, Parang, 2023]. Замкнутая полипептидная цепь, как правило, стабилизированная дисульфидными связями, малые размеры и способность многих из них проникать через клеточные мембраны обеспечивают устойчивость циклических пептидов различного происхождения к протеолизу, в том числе в пищеварительном тракте, что позволяет им оказывать

воздействие как на микробиом кишечника, так и на поглотивший их организм [Behsaz et al., 2020].

В настоящее время циклические пептиды растений, синтезирующиеся на рибосомах (существует также множество пептидов с нерибосомальным синтезом), подразделяют на три группы – циклотиды, PawS-derived peptides (PDPs), к которым относится SFTI-1 и орбитиды [Craik et al., 2018; Shirsat et al., 2025]. Циклотиды представляют собой замкнутые пептидной связью в кольцо полипептиды, состоящие из 28–37 аминокислотных остатков, «перехваченные» тремя дисульфидными связями, которые в совокупности с водородными связями формируют весьма жесткую и стабильную структуру. Они найдены у всех представителей семейства Violaceae и лишь у отдельных видов из семейств Rubiaceae, Cucurbitaceae, Fabaceae и Solanaceae. Циклотиды присутствуют в различных частях растений и проявляют инсектицидную и антимикробную активность. Особый интерес для медицины вызывает их противоопухолевая, цитотоксическая, гемолитическая, утеротоническая, а также анти-ВИЧ активность. Некоторые из них являются ингибиторами трипсина, например, состоящий из 34 аминокислотных остатков пептид MCoTI-II из тыквы *Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng., использованный в качестве основы для конструирования пептидов, ограничивающих аномальный ангиогенез [Chan et al., 2016] или проявляющих токсичность к клеткам миелоидного лейкоза [D'Souza et al., 2016].

SFTI-1 и родственные ему пептиды типа PDPs, представляющие вторую группу циклических пептидов растений, уникальны еще и тем, что обнаружены только в семенах культурного и диких видов рода *Helianthus* L. (подсолнечник) и близких ему видов подтрибы Helianthinae трибы Heliantheae [Konarev et al., 2000a, 2002a; Jayasena, 2017]. Ни в каких других таксонах растений столь малых циклических ингибиторов пока не найдено. Кроме того, SFTI-1 превосходит все известные у растений ингибиторы трипсина по активности, обладая K_i менее 0.1 nM [Luckett et al., 1999; Jayasena, 2017]. Его характерной особенностью является также скрепляющая пептид единственная дисульфидная связь (Рис. 1).

Представители третьей группы циклических пептидов, орбитиды, содержат от 6 до 16 аминокислотных остатков и характеризуются отсутствием дисульфидных связей. Около 200 их вариантов найдены у представителей Asteridae и других групп растений [Tan, Zhou, 2006; Chekan et al., 2024].

SFTI-1 как исходная структура для конструирования пептидов с заданными функциями

SFTI-1 привлек внимание многих исследователей в качестве исходной структуры для конструирования пептидов с заданными функциями, которые могут найти применение во многих областях биологии, сельского хозяйства и медицины. Ему посвящены сотни статей и интерес к нему не снижается – каждый год появляются десятки публикаций, касающихся различных аспектов изучения и применения данного белка, о нем опубликованы многочисленные обзоры [Lesner et al., 2011; Franke, et al., 2018; de Veer et al., 2021., Кузнецова (Kuznetsova) и др., 2016; Mah et al., 2025; Hashemzaei et al., 2025; Rezende et al., 2025]. В данном обзоре мы лишь кратко рассмотрим основные итоги этих исследований. На основании имеющихся сведений, среди свойств, являющихся предпосылкой для использования SFTI-1 в качестве основы для создания разнообразных биологически-активных пептидов, можно выделить: высокую стабильность благодаря циклической структуре и жёсткой конформации, стабилизированной дисульфидной связью и сетью водородных связей; устойчивость к протеазам и температурным воздействиям; возможность модификации без потери структурной целостности; малый размер (14 аминокислот), облегчающий химический синтез и модификацию; способность проникать в органы и клетки. Его применение охватывает создание терапевтических средств (в том числе орально доступных), диагностических агентов и инструментов для фундаментальных исследований. Развитие биотехнологических методов открывает путь к масштабированию и коммерциализации технологий на основе SFTI-1. Приведем лишь часть из множества известных примеров применения SFTI-1 для решения проблем биологии и медицины. Благодаря устойчивости к ферментативному расщеплению и возможности встраивания чужеродных биологически активных пептидов в его петлевую структуру, SFTI-1 активно используется в стратегии графтинга (grafting) для создания терапевтических и диагностических молекул. На основе SFTI-1 создан высокоактивный и селективный ингибитор катепсина G, который может применяться при воспалительных и онкологических заболеваниях [Swedberg et al., 2017]. Также разрабатываются ингибиторы калликреинов, связанных с раком и кожными патологиями [de Veer et al., 2013]. Встраивание миметиков тромбоспондина-1 в SFTI-1 позволило получить стабильные циклические пептиды, подавляющие миграцию эндотелиальных клеток и обладающие потенциалом для терапии опухолей [Chan et al., 2015]. В области

нейродегенеративных заболеваний модифицированные варианты SFTI-1 показали способность ингибировать образование фибрилл тау-белка, что открывает перспективы для лечения болезни Альцгеймера [Wang et al., 2016]. Высокая аффинность к сериновым протеазам и гибкость при модификациях обеспечивают возможность замен аминокислотных остатков в ключевых позициях, например, P1, что позволяет изменять специфичность к различным протеазам [Legowska et al., 2009]. Таким путем были получены высокоактивные ингибиторы для связанной с заболеваниями кожи протеазой KLK5 [Li et al., 2019a; Mah et al., 2025], важной мишени терапии онкологических заболеваний – матриптазы [Quimbar et al., 2013], плазмина, протеасом и других протеаз [De Veer et al., 2021]. Молекулярный графтинг путем встраивания биологически активных пептидов в петли SFTI-1 позволил нацеливаться на другие типы мишеней с целью терапии воспалений, ожирения или диагностики онкологических заболеваний [Caceres et al., 2017; Durek et al., 2021]. Включение фрагмента эндогенного опиоидного пептида динорфина А в SFTI-1 придало полученной молекуле свойства перспективного и лишённого побочных эффектов анальгетика [Muratspahić et al., 2021]. Приведенными примерами перечень возможных путей применения SFTI-1 далеко не ограничивается. Вполне возможно, что данный ингибитор, способный подавлять сериновые протеазы вредных насекомых и фитопатогенных грибов, может быть использован и при создании эффективных средств защиты растений.

Происхождение SFTI-1 и его эволюционные связи с другими ИП

Интересен вопрос о связи SFTI-1 с другими известными ИП. У всех живых организмов описано множество вариантов ИП, которые по своим свойствам и структуре распределены по более чем 80 семействам [Rawlings et al., 2018]. У ИП из растений выделяют не менее 12 основных семейств [Mosolov, Valueva, 2005; Hellinger, Gruber, 2019; Cid-Gallegos et al., 2022].

После обнаружения SFTI-1 стала очевидной значительная гомология его аминокислотной последовательности, в особенности ее 9-членного участка между двумя остатками цистеина - СТКСИППИС-, формирующими ингибиторную петлю, с первой из двух ингибиторных петель «двухголового» классического ингибитора ВВ1 из сои *Glycine max* (L.) Merr. или родственных ему ингибиторов из люцерны усеченной *Medicago truncatula* Gaertn. и других бобовых, специализированной на подавлении трипсина [Sreerama, Gowda, 1997; Luckett et al., 1999; Debreczeni et al., 2003; Qi et al., 2005] (Рис. 2).

альбуминов, включая *HaG5*, *pHAO*, *SFA8*, *PawS1* и *PawS2* [Mylne et al., 2011, 2014]. Ген *SFA8* кодирует мономерный зрелый альбумин, а каждый из генов *PawS1* и *PawS2* кодирует типичный гетеродимерный альбумин, и, кроме того, небольшой циклический пептид. АЕР «вычлениет» из полипептида *PawS1* по остаткам аспарагина Asn35 and Asp49 ингибитор SFTI-1 (Рис. 4), а также малые и большие субъединицы 2S альбумина. Кроме того, данная протеаза, обладающая также лигирующей активностью, «сшивает» концы первого пептида по остаткам глицина (G) и аспарагиновой кислоты (D), в результате чего формируется зрелый циклический SFTI-1 [Mylne et al., 2011b].

По мнению этих авторов, *PawS1* и *PawS2* подсолнечника представляют собой интересные примеры инноваций внутри препроальбумина. Эти два гена кодируют в остальном “нормальные” альбумины напинового типа, но в области между сигнальной последовательностью и малой субъединицей альбумина находятся участки, которые в результате процессинга ферментом АЕР формируют малые циклические пептиды, имеющие одну дисульфидную связь – скрытый в *PawS1* и состоящий из 14 аминокислотных остатков ингибитор трипсина SFTI-1, и скрытый в *PawS2* состоящий из 12 остатков пептид SFT-L1, схожий по последовательности с SFTI-1, но не обладающий ингибирующей активностью в отношении трипсина. Единственным известным пока подобным примером совместного синтеза запасного белка и ингибитора трипсина является белок PV100 из семян тыквы. В данном случае исходный полипептид расщепляется протеазой АЕР на запасной вицилин-подобный белок и несколько пептидов, один из которых, C2, характеризуется высоким содержанием цистеина, ингибирует трипсин [Yamada et al. 1999] и близок по первичной структуре двуспиральному ингибитору трипсина VhTI из семян вероники [Konarev et al., 2004; Connors et al., 2007]. И в том, и в другом случае в составе одной полипептидной цепи синтезируются как запасной белок, так и потенциально защитные белки, в том числе, ингибиторы, которые могут подавлять, например, протеазы атакующих семена подсолнечника или тыквы грибов или насекомых, способные разрушить запасной белок [Yamada et al. 1999; Elliott, et al., 2014]. Отличие заключается в том, что процессинг полипептида из тыквы протеазой АЕР не сопровождается циклизацией малых пептидов, как это имеет место при процессинге полипептида, кодируемого геном *PawS1* у подсолнечника.

Закономерен вопрос о происхождении SFTI-1. Несмотря на явную гомологию SFTI-1 с ингибиторной петлей классического ингибитора Bowman-Birk (BBI), A. Elliott et al [2014] и A. Jayasena

et al. [2017] считают, что SFTI-1 возник независимо от ингибиторов данного типа, характерных для таксонов растений, не входящих в кладу Астериды (например, бобовых или злаков), а сходство между ними объясняется лишь конвергенцией. То же, по их мнению, справедливо и для объяснения сходства SFTI-1 с низкомолекулярным ингибитором из кожи лягушки *Odorrana livida* (Blyth, 1856), также причисляемого к BBI-подобным ингибиторам [Li et al., 2007; Jayasena et al., 2017; Yang et al., 2022]. Из возможных путей возникновения новых белков австралийских исследователей привлек вариант генетической экспансии.

Выяснилось, что, если SFTI-1 есть только у подсолнечника и ближайших к нему родов, то циклические пептиды с похожей структурой, но без ингибиторной активности и с неясной пока биологической активностью типа SFT-L1, есть у более широкого круга сложноцветных из подсемейства *Asteroideae*. Все они также синтезируются в составе препроальбуминов [Jayasena et al., 2017]. Эти авторы на основании анализа последовательностей, кодирующих 2S альбумины у более ста представителей подсемейства *Asteroideae* предложили следующую схему происхождения генов препроальбуминов подсолнечника. По их мнению, в результате какого-то события генетической экспансии около 45 миллионов лет назад на основе фрагмента последовательности, кодирующей предшественник альбумина, на участке между сигнальным пептидом и малой субъединицей 2S альбумина возникла дополнительная последовательность, кодирующая небольшой пептид, который под действием имеющейся у растения аспарагинил-эндопептидазы (АЕР) мог становиться циклическим. Спустя миллионы лет, у пептида возникла дисульфидная связь, а относительно недавно, 22 миллиона лет назад, этот пептид приобрел трипсин-ингибирующую активность [Jayasena et al., 2017]. Как признают сами авторы, пока неизвестны другие подобные примеры эволюции новой белок кодирующей последовательности внутри существующей рамки считывания (ORF). Особенность полипептида, кодируемого геном *PawS1*, заключается в том, что новый пептид SFTI-1 не нарушил предковую функцию предшественника запасного альбумина семян, а лишь дополнил ее. Нужно признать, что эта очень красивая гипотетическая схема, составленная на основе анализа обширного экспериментального материала, имеет право на существование. В то же время при рассмотрении данной схемы остаются неясными ряд вопросов, а имеющиеся в литературе и базах данных сведения указывают на возможность взглянуть на проблему происхождения SFTI-1 и с другой стороны.

Представляется труднообъяснимым, что согласно теории Jayasena et al. [2017], такой совершенный, высоко комплементарный трипсину фитофагов белок-ингибитор возник практически из ничего за очень короткий в эволюционном масштабе срок и почему-то только у подсолнечника. Как было показано ранее [Konarev et al., 1999b, 2002a, 2004], большинство видов семейства Asteraceae (Сложноцветные) успешно «обходятся» без специализированных ингибиторов трипсина в семенах, видимо, отчасти, за счет ингибиторов трипсина/химотрипсина, химотрипсина/субтилизина и подобных представителей семейства ингибитора химотрипсина I из картофеля, широко представленного у большинства высших и низших растений. Из ближайших к подсолнечнику таксонов отличные от SFTI-1 ингибиторы именно трипсина были найдены в семенах циннии *Zinnia elegans* Jacq. (ZTI, 11350 Da), гайлардии *Gaillardia aristata* Pursh (14753 Da) и сильфиума *Silphium perfoliatum* L. (11439 Da) [Konarev et al., 2004]. N-концевое секвенирование позволило выявить некоторую гомологию ZTI с ВВ1 [Konarev et al., 2004], однако позднее при более детальном анализе данных стала очевидной гомология последовательности данного фрагмента ZTI циннии с N-концевой последовательностью малой субъединицы 2S альбумина подсолнечника, представленной на рис. 4 в составе фрагмента полипептида-предшественника PawS1 и последовательностями малых субъединиц других 2S альбуминов. То есть ZTI, по-видимому, принадлежит к группе ингибиторов протеаз, близких по структуре

2S альбуминам многих растений [Monsalve et al., 2004; Souza et al., 2016], в том числе *Zinnia haageana* Regel (GenBank: AIW56801) (Рис. 4). Возможно, что ИТ *G. aristata* и *S. perfoliatum* принадлежат к этой же группе 2S альбуминов. Таким образом, подсолнечник и родственные ему виды в силу пока неизвестных обстоятельств выработали в эволюции два существенно отличных варианта специализированных ингибиторов трипсина, причем у последних такие ингибиторы принадлежат к широко распространенной у растений группе белков. Если исходить из теории австралийских исследователей, обосновывающей возникновение уникального компактного высокоспециализированного ингибитора трипсина практически из ничего за относительно короткий в эволюционном плане период, то следует допустить существование на определенном этапе мощного внешнего фактора, обусловившего отбор формы белка, обеспечивающей обладающему ею растению существенное преимущество перед другими растениями, а, возможно, и само выживание. Такими факторами, в принципе, могли быть насекомые-фитофаги или фитопатогенные грибы, у которых усвоение растительных белков существенно зависело от трипсиноподобных протеаз как, например, у ныне живущих представителей рода *Aspergillus* [Dubovenko et al., 2010]. Внешние факторы, провоцирующие ускоренную микроэволюцию в условиях сильного стресса и ситуация «бутылочного горлышка» теоретически могли способствовать формированию нового белка и закреплению результатов отбора в популяции.

SFTI-1	1	<u>GRCTKSIPPICFPD</u>	14
PawS1	35	<u>NGRCTKSIPPICFPDGLDNP</u>	77
		RGC---QIPIQKLNHCQMH	77
		P---C---QIAIEKLNHCQMH	
ZTI	1	PWEQC-RSQIAIEKLNHCQMH	20
		P EQC R QI I+ LNHCQMH	
AIW56801	110	PREQCDR-QIPIQQLNHCQMH	129

Рис. 4. Сравнение аминокислотных последовательностей зрелого SFTI-1 [Luckett et al., 1999], фрагмента предшественника PawS1, включающего SFTI-1 и малую субъединицу запасного 2S альбумина подсолнечника [Mylne et al., 2011b], N-концевого фрагмента ингибитора трипсина из семян *Zinnia elegans* Jacq. ZTI [Konarev et al., 2004] и фрагмента предшественника PawS1a *Zinnia haageana* Regel [Jayasena et al., 2014, GenBank: AIW56801]. Последовательность SFTI-1 выделена подчеркиванием, а малой субъединицы 2S альбумина – серым цветом.

Fig. 4. Alignment of amino acid sequences of mature SFTI-1 [Luckett et al., 1999], a fragment of the PawS1 precursor including SFTI-1 and the small subunit of sunflower storage albumin 2S [Mylne et al., 2011b], the N-terminal fragment of the trypsin inhibitor from the seeds of *Zinnia elegans* Jacq. ZTI [Konarev et al., 2004], and a fragment of the PawS1a precursor from *Zinnia haageana* Regel [Jayasena et al., 2014, GenBank: AIW56801]. The SFTI-1 sequence is underlined, and the small subunit of 2S albumin is in gray.

Одна из уникальных черт SFTI-1 – его чрезвычайно узкая распространенность, ограниченная лишь видами рода *Helianthus* и ближайших к нему родов подтрибы Helianthinae. Большинство характерных для растений типов (семейств) ингибиторов протеаз представлены во многих или в большинстве таксонов растений, а многие имеют гомологов и у животных. Это справедливо, например, для представителей семейства картофельного ингибитора химотрипсина I [Baskova, Zavalova, 2001], VhTI-подобных белков или α -харпининов [Nolde et al., 2011] и других. BBI-подобные ингибиторы трипсина, помимо многих таксонов растений, найдены в коже лягушек, причем ряд из них по размеру и структуре (кроме замкнутости в кольцо) сходны с SFTI-1 [Malik et al., 2015]. Исследователи полагают, что гомология SFTI-1 с ингибиторами семейства BBI растений и BBI-подобными ингибиторами амфибий, ингибиторов семейства картофельного ингибитора I из растений и гомологичных ингибиторов из пиявок или VhTI-подобных ингибиторов из растений с двуспиральными ингибиторами из моллюсков объясняется конвергенцией в ходе независимой эволюции, хотя прямых подтверждений этому нет.

Следует еще раз отметить, что новые гены, как правило, возникают в результате преобразования уже существующих генетических структур. Среди механизмов такого преобразования, возможно имеющих отношение к возникновению SFTI-1, можно отметить дубликацию генов, их слияние (gene fusions), а также формирование новых генов из некодирующих последовательностей [Kaessmann, 2010]. При этом остается вопрос о быстром формировании «с нуля» такой высокоспециализированной и совершенной структуры как SFTI-1, имеющей в то же время сходство с известными у других растений ингибиторами семейства BBI. В связи с этим представляется интересным рассмотреть и другие возможные пути происхождения SFTI-1, в том числе, той «затравки», на базе которой сформировался данный белок.

Как уже говорилось выше, очевидно сходство SFTI-1 с ингибиторной петлей ингибиторов типа BBI. BBI характерны, в первую очередь, для злаков, бобовых и еще нескольких таксонов, но не для Сложноцветных и других представителей клада Астерида. При этом те же австралийские исследователи обнаружили BBI у мхов [James et al., 2017]. По мнению авторов, на основе BBI мхов в ходе эволюции сформировались «одноголовые» BBI однодольных с одной ингибиторной петлей и «двухголовые» BBI двудольных с двумя такими петлями, то есть несколько отличающиеся по структуре ингибиторы обоих таксонов имеют общее происхождение. Таким образом, у дальних предков всех цветковых растений, включая подсолнечник, соответствующие SFTI-1 структуры присутствовали, то есть BBI не совсем «чужие» для сложноцветных. Здесь может быть уместным упомянуть публикацию Kreis et al. (1985), в которой были выявлены эволюционные связи BBI с другими растительными белками, включая запасные и ингибиторы ферментов. По мнению этих авторов, структурные гены этих белков возникли из одного анцестрального гена, предположительно ИП. Дубликация гена и последующая дивергенция привела к появлению ингибиторов типа BBI. Дубликации одного из домен-кодирующих участков гена дали начало гену, кодирующему ряд гомологичных доменов, которые в результате дивергенции преобразовались в гены α -глиаина и HMW глютеина пшеницы, а также 2S альбуминов бобовых и других растений. На основании этих соображений, можно предположить, что проальбумин PawS1 теоретически может являться результатом дубликации и последующей дивергенции, сопровождающейся множественными рекомбинациями некоего прото-BBI гена, приведшими в итоге к формированию гена, кодирующего несколько доменов. Первый домен мог дойти до нашего времени в форме SFTI-1 – сильно «урезанного» фрагмента BBI (еще более сокращенного, чем одноголовые BBI однодольных), а остальные – 2S альбумина.

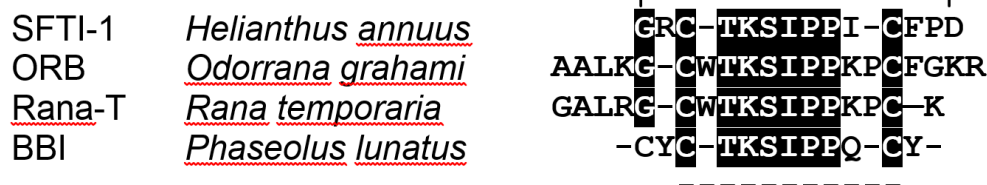


Рис. 5. Аминокислотные последовательности низкомолекулярных ингибиторов трипсина из семян подсолнечника (SFTI-1) [Luckett et al., 1999] и кожи амфибий с ингибиторными петлями (- - -) [Malik et al., 2015], гомологичными петле ингибитора типа BBI из лимских бобов [Debreczeniy et al., 2003]. Остатки идентичные SFTI-1 выделены светлым шрифтом на темном фоне.

Fig. 5. Amino acid sequences of low-molecular-weight trypsin inhibitors from sunflower seeds (SFTI-1) and amphibian skin with inhibitor loops (- - -) [Malik et al., 2015] homologous to the loop of the BBI-type inhibitor from lima beans [Debreczeniy et al., 2003]. Residues identical to those of the SFTI-1 are shown in black boxes.

Следующий ряд предположений может быть основан на гомологии SFTI-1 с ингибиторами трипсина и другими белками, обнаруженными, как у растений, так и у эволюционно далеких от них организмов. Очень близкие SFTI-1 по размеру и первичной структуре ИТ были найдены, как это ни покажется странным, в коже амфибий [Li et al., 2007; Malik et al., 2015]. Они там присутствуют наряду с другими антимикробными пептидами и токсинами, но в отличие от SFTI-1 они не циклические. Различия в их ингибиторных петлях заключаются лишь в двух дополнительных аминокислотных остатках у ингибиторов из амфибий (Рис. 5). Эти авторы, а также [Elliott et al., 2014] полагают, что эволюционно они никак не связаны с другими известными белковыми ингибиторами, и что ВБИ-подобные ингибиторы у лягушек, как и ингибитор у подсолнечника возникли в результате конвергенции.

Чтобы проверить это предположение, мы сравнили известные аминокислотные последовательности предшественников данных ВБИ-подобных ингибиторов протеаз с другими ингибиторами у амфибий (Рис. 6). Обнаружилось явное, на наш взгляд, сходство предшественников у ВБИ-подобных ингибиторов и ингибиторов семейства Казалья у амфибий. Отметим, что последовательности ингибиторных петель как ингибиторов Казалья, так, впрочем, и ингибиторов типа Бауман-Бирк из растений весьма изменчивы. Так, аминокислотная последовательность второй

ингибиторной петли из ВБИ люцерны «CTLSIPAQC» (Рис.2) отличается от последовательности первой петли «CTKSIPPQC» не в меньшей степени, чем последовательности гомологичных петель ингибиторов Казалья из амфибий.

Важны ключевые для функционирования ингибитора остатки – два остатка цистеина, замыкающие ингибиторную петлю, остаток в позиции P1, определяющий специфичность ингибитора к тем или иным протеазам, и один или два остатка пролина. Например, у ингибитора Казалья 1 даже длина последовательности сигнального пептида с пропептидом, до первого остатка цистеина в ингибиторной петле, совпадает с таковой у ВБИ-подобного ингибитора из другой амфибии. То есть, можно предположить, что ВБИ-подобные ингибиторы у амфибий могли возникнуть не в ходе полностью независимой конвергентной эволюции, а в результате преобразования и упрощения какой-то исходной формы ингибитора протеаз, которая дала начало ингибиторам Казалья и ВБИ-подобным формам ингибитора. Конечно, при подобном допущении нужно учитывать, что ингибиторы Казалья и ВБИ существенно отличаются по пространственной организации и расположению дисульфидных связей вне ингибиторных петель, однако сходство первичных структур их ингибиторных петель заслуживает более внимательного рассмотрения.

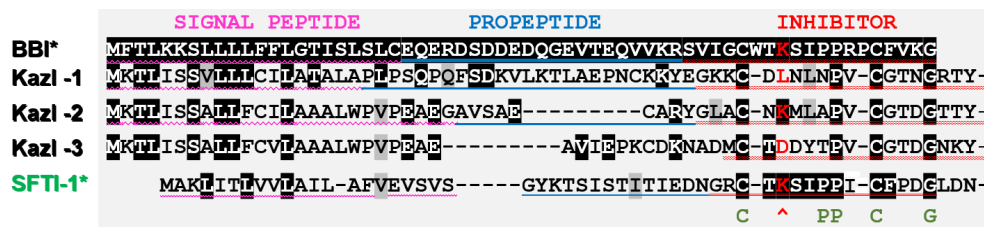


Рис. 6. Сравнение аминокислотных последовательностей предшественников ВБИ-подобного ингибитора трипсина (*) и ингибиторов протеаз типа Kazal (Kazal) из кожи амфибий и SFTI-1* из семян подсолнечника. BBI*, предшественник ВБИ-подобного ингибитора трипсина из *Odorrana versabilis* Liu and Hu CAO98859; KazI-1, предшественник ингибитора протеаз Казалья из *Cruziohyala calcarifer* (Boulenger, 1902) ANN87755; KazI-2, предшественник ингибитора трипсина Казалья из *C. calcarifer* ANN87740; KazI-3, предшественник ингибитора протеаз Казалья PSKP-1 из *Phyllomedusa nordestina* (Caramaschi, 2006) AFY11407; SFTI-1* (----) в составе фрагмента предшественника запасного 2S альбумина PawS1 из семян подсолнечника *Helianthus annuus* (XP_022026963). ^, остатки P1, определяющие специфичность ингибиторов к протеазам (выделены красным шрифтом). Остатки идентичные остаткам предшественника ВБИ-подобного ингибитора трипсина из *O. versabilis* выделены светлым шрифтом на черном фоне, консервативные замены выделены серым цветом.

Fig. 6. Alignment of amino acid sequences of precursors of BBI-like trypsin inhibitor (*) and Kazal-type protease inhibitors from amphibian skin and SFTI-1* from sunflower seeds.

BBI*, *Odorrana versabilis* Liu and Hu Bowman-Birk trypsin inhibitor precursor CAO98859; KazI-1, *Cruziohyala calcarifer* (Boulenger, 1902) Kazal proteinase inhibitor precursor ANN87755; KazI-2, *C. calcarifer* Kazal trypsin inhibitor precursor TI ANN87740; KazI-3, *Phyllomedusa nordestina* (Caramaschi, 2006) Kazal protease inhibitor PSKP-1 AFY11407. SFTI-1* (----) as part of PawS1, precursor of *Helianthus annuus* 2S seed storage albumin XP_022026963. ^, residues P1, determining the specificity of the inhibitors to proteases (shown in red letters). Residues identical to those of the *O. versabilis* Bowman-Birk-like trypsin inhibitor precursor are shown in black boxes, conserved substitutions are in grey boxes: nonrelated residues are in black letters in white boxes.

Циклический ингибитор трипсина из семян подсолнечника SFTI-1

Мы провели более детальный поиск гомологов и для SFTI-1 (Рис. 7). Следует отметить, что ингибиторы семейства Казалья, широко распространены у животных, человека и других организмов, где выполняют ряд важнейших функций. Но они есть и у растений. Они выявлены у представителей многих таксонов цветковых растений в том числе, у сложноцветных. Кроме того, они есть у многих грибов, оомицетов и даже бактерий. Рисунок демонстрирует очевидное сходство аминокислотных последовательностей в районе ингибиторных петель между предшественниками SFTI-1 подсолнечника, ингибиторов Bowman-Birk бобовых, ингибиторов Казалья у фитофотры, актинии, и человека, а также ингибиторов типа WAP (Whey acidic protein) у обезьян и так далее. Гипотетический белок лягушки *Xenopus tropicalis* (Gray, 1864), по-видимому, также входит в круг указанных ингибиторов с остатком аспарагина (N) в позиции P1, определяющим, теоретически, специфичность к AEP [Poreba, 2019].

Что удивительно, в предшественниках ингибиторов трипсина типа Казалья и WAP у приматов примерно в тех же позициях, что и у PawS1 подсолнечника присутствуют потенциальные сайты протеолиза (и циклизации) аспарагинил эндопептидазой – остатки аспарагина (N) и аспарагиновой кислоты (D). Кроме того, у ингибиторов из фитофотры и актинии позиции остатка аспарагиновой кислоты совпадают с позицией остатка D № 14 SFTI-1. Какова роль этих сайтов в предшественниках ингибиторов протеаз у приматов, пока не ясно, хотя известно, что циклические пептиды широко представлены в их организмах [Falanga et al., 2017; Behsaz et al., 2020]. В качестве любопытного факта можно отметить и видимую гомологию SFTI-1 и ингибиторов протеаз Казалья с участками последовательности проламинов злаков. Интересно, что гидролизаты глиадинов обладают ингибирующей активностью к некоторым пептидазам [Thewissen et al., 2011].

Organism	Inhibitor/ Protein	UniProtKB	AEP	P1	AEP
<i>Helianthus annuus</i>	SFTI-1	1SFI_I	1	G	14
<i>Helianthus annuus</i>	PawS1*	Q4GWU5	-EDNG-	RCTKSIPPICFPD	GLDN-
<i>Glycine max</i>	BBI*	KRH40470	-CDKC-	YCSKSIPPKCY	CADVGI-
<i>Medicago truncatula</i>	BBI*	AES80150	-CDSC-	ECTKSIPPOCH	CTDIGE-
<i>Helianthus annuus</i>	Kazal inhibitor*	KAF5795504.1	-PEFCP	INCFR	-PDEVCGADNV
<i>Phytophthora infestans</i>	Kazal inhibitor*	AAT00508	-GDKCPT	RCTRDYRPI	CGSDGITY-
<i>Homo sapiens</i>	Kazal inhibitor*	P00995	-ELNG-	CTKIYDPV	CGTDENTY-
<i>Pan troglodytes</i>	WAP12 inhibitor*	NP_001129325	-ADNV-	RCFKSDPP	QCHTDQDCL-
<i>Macaca mulatta</i>	WAP12 inhibitor*	EHH19667	-ADNI-	RCFKSDPP	QCHTDQDCL-
<i>Exaiptasia pallida</i>	Kazal inhibitor*	XP_020897061	-CQAI-	RCSKDFK	PVCGSDVSY-
<i>Xenopus tropicalis</i>	hypot. protein*	OCA45968	-CNGN-	SCONVEPPH	CEGLFEKK-
<i>Aegilops sharonensis</i>	alpha-gliadin*	AMS25618	-TLPA-	MENVYIP	PPYCSTTIAP-
<i>Triticum aestivum</i>	gamma-gliadin*	AAA34272	-TLPT-	MENVYVPP	DCSTINVPY-

Рис. 7. Сравнение фрагментов аминокислотных последовательностей SFTI-1 и предшественников (*) различных белков, включающих ингибиторные петли SFTI-1 подсолнечника (PawS1), ингибиторов Bowman-Birk, Kazal и WAP из растений и других организмов, а также участки последовательностей предшественников проламинов злаков. AEP со стрелкой – сайты протеолиза PawS1 аспарагинил эндопептидазой. P1 – остатки, определяющие специфичность ингибиторов к протеазам (выделены цветным шрифтом). Остатки идентичные остаткам предшественника PawS1 выделены светлым шрифтом на черном фоне, консервативные замены выделены серым цветом.

Fig. 7. Alignment of amino acid sequence fragments of SFTI-1 and precursors (*) of various proteins, including inhibitory loops of sunflower SFTI-1 (PawS1), Bowman-Birk, Kazal, and WAP inhibitors from plants and other organisms, and sequence fragments of cereal prolamins. AEP with an arrow are the sites of PawS1 proteolysis by asparaginyl endopeptidase. P1, residues that determine the specificity of inhibitors to proteases (highlighted in color). Residues identical to residues of the PawS1 precursor are highlighted in light font on a black background; conservative substitutions are highlighted in gray.

Очевидно, главное – есть сходство первичной структуры в области ингибиторных петель у предшественника SFTI-1 и ингибиторов протеаз типа BBI, Kazal и WAP из различных организмов. Это дает основание высказать несколько из возможных предположений о происхождении SFTI-1. Например, он мог возникнуть на основе преобразований существующих структур в самом подсолнечнике. У него найдены гены, кодирующие белки, гомологичные представителям “суперсемейства доменов Казала” (Kazal domain superfamily protein), например, KAF5795504.1 (Рис. 7), причем положению остатка лизина (K) в позиции P1 у SFTI-1 соответствует остаток аргинина (R) у упомянутого белка. Как известно, лизин и аргинин в данной позиции определяют специфичность ингибитора к трипсину, а у родственных подсолнечнику видов гомологи SFTI-1 в позиции P1 содержат аргинин [Jayasena et al., 2017]. Известно, что ингибиторы протеаз Казала у растений способны подавлять развитие фитопатогенных грибов и бактерий [Sánchez et al., 2026].

Процесс внедрения «затравки» для будущего SFTI-1 в предковый ген 2S альбумина мог проходить, например, с участием мобильных генетических элементов, играющих важную роль в эволюции подсолнечника [Staton et al., 2012; Ventimiglia et al., 2023]. Самое радикальное предположение – горизонтальный перенос [Soucy et al., 2015] генетического материала, кодирующего ингибиторную петлю от ингибитора Казала (или BBI) из паразитических растений, оомицетов типа фитофторы (Рис. 7) или грибов, контактирующих с растением хозяином на клеточном уровне. Конечно, горизонтальный перенос генов между эукариотами, в частности, растениями – явление значительно более редкое, чем между прокариотами или между прокариотами и эукариотами, однако он существует [Keeling, 2024]. Известны примеры произошедших десятки миллионов лет назад переносов генов из паразитических растений семейства *Orobanchaceae* в растения-хозяева, принадлежащие к различным таксономическим группам [Philips et al., 2022], причем эти гены теперь несут важные сельскохозяйственные культуры [Hibdige et al., 2021]. У представителей *Orobanchaceae* выявлены гены ингибиторов протеаз Казала [GenBank: GER32220.1; Yoshida et al., 2019], а к этому семейству принадлежит и опасный паразит подсолнечника – заразиха *Orobanche cumana* Wallr. Паразитические растения из семейства *Orobanchaceae* способны выступать не только как доноры генов для растений-хозяев, но и как реципиенты. Это было показано на примере генов токсичных для насекомых запасных альбуминов,

воспринятых паразитами от бобовых [Zhang et al., 2013]. Отдельный интерес в связи с темой настоящего обзора представляют оомицеты, среди которых много опасных фитопатогенов [Wang et al., 2025]. Фитофтора, отдельные виды которой представляют угрозу и для подсолнечника [Gulya et al., 1997], при взаимодействии с растением выделяет множество форм ингибитора Казала, которые подавляют защитные протеазы растения и тем самым ослабляют его иммунитет [Tian et al., 2005a, 2005b]. Примеры горизонтального переноса генов от оомицетов в растения пока не известны, однако интересно, что они сами, включая фитофтору, приобрели ферменты, обеспечивающие разрушение тканей хозяина, за счет горизонтального переноса генов от грибов, что способствовало лучшей адаптации оомицетов к паразитизму на растениях [Richards et al., 2011; Savory et al., 2015].

Предпосылки для возможного переноса обсуждаемых генов или их фрагментов и их закрепления в геноме, в частности, в составе генов 2S альбуминов могли возникнуть в момент каких-то стрессов, расшатывающих стабильность генетического аппарата растения, например, в очень неблагоприятных для растения условиях или в момент произошедшего около 30 миллионов лет назад удвоения генома подсолнечника [Barker et al., 2008; Badouin et al., 2017].

Заключение

Ингибитор SFTI-1 представляет собой универсальный и технологичный пептид, отличающийся малым размером, стабильностью и высоким биоинженерным потенциалом. Перспективы его практического применения, в частности, в медицине трудно переоценить. С другой стороны, выяснение происхождения SFTI-1 может расширить представления о путях формирования новых генов, включая тех из них, которые контролируют различные по структуре, но, возможно, функционально связанные белки. Как SFTI-1 у подсолнечника, так и пептидный ингибитор C2, синтезирующиеся на одной полипептидной цепи с запасными белками могут защищать последних от протеаз фитофагов. Вопрос о происхождении уникального циклического ингибитора SFTI-1 у подсолнечника пока нельзя считать окончательно закрытым. По-видимому, помимо теории конвергентного с BBI происхождения данного ингибитора, по которой практически из ничего довольно быстро возникла такая совершенная и высокоспециализированная структура, следует рассматривать и другие возможные пути эволюции данного белка, в том числе, базирующиеся на преобразованиях известных и широко

распространенных у разных организмов эволюционно древних белковых структур.

Автор благодарен доктору биологических наук И.Н. Анисимовой за ценные замечания, сделанные при подготовке рукописи.

Работа выполнена в рамках государственного задания согласно тематическому плану ВИР по проекту No FGEM-2022-0005 «Растительные ресурсы масличных и прядильных культур ВИР как основа теоретических исследований и их практического использования» и по тематическому плану ВИЗР по проекту No FGEU-2025-0002.

Рукопись получена редакцией 5 марта 2026 г.

Принята к публикации 12 марта 2026 г.

Литература

1. Анисимова И.Н., Алпатьева Н.В., Горюнова С.В. и др. Структурная изменчивость гена богатого метионином альбумина SFA8 подсолнечника. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2018. 179(4). 91-103. DOI: 10.30901/2227-8834-2018-4-91-103
2. Конарев А.В. Компонентный состав и генетический контроль ингибиторов α -амилаз насекомых из зерна пшениц и эгилопсов. *Докл ВАСХНИЛ*. 1982. 6. 42-44.
3. Конарев А.В. Молекулярные аспекты иммунитета растений и их коэволюции с насекомыми. *Биосфера*. 2017. 9(1). 79-99. DOI: 10.24855/biosfera.v9i1.325
4. Конарев А.В., Фомичева Ю.В. Перекрёстный анализ взаимодействия компонентов α -амилаз и протеиназ насекомых с белковыми ингибиторами из эндосперма пшеницы. *Биохимия*. 1991. 56(4). 628-638.
5. Конарев Ал.В. Ингибиторы гидролаз в изучении генофонда пшеницы и родственных ей злаков. *Сб. науч. тр. по прикл. бот. ген. и сел. ВИР*. 1987. 114. 34-47.
6. Конарев Ал.В. Анализ ингибиторов протеиназ из зерна пшеницы методом желатиновых реплик. *Биохимия*. 1986. 51(2). 195-201
7. Конарев Ал.В. Белковые ингибиторы гидролаз в защитных механизмах растений. В кн: *Защита растений в условиях реформирования агропромышленного комплекса: экономика, эффективность, экологичность. Тез. докл. Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений*. 1995. 205-206.
8. Конарев В.Г., Гаврилюк И.П., Губарева Н.К. и др. Под ред. В.Г.Конарева. Идентификация сортов и регистрация генофонда культурных растений по белкам семян. 2000с. Санкт-Петербург: ВИР. 2000. 186 С.
9. Кузнецова С.С., Колесанова Е. Ф., Таланова А.В. и др. Перспективы создания новых ингибиторов терапевтически значимых сериновых протеаз на основе кноттинов и пептидного ингибитора трипсина из семян подсолнечника (SFTI 1). *Биомед. химия*. 2016. 62(4). 353-368. DOI: 10.18097/PBMC20166204353
10. Abdalla MA, McGaw LJ. Natural cyclic peptides as an attractive modality for therapeutics: A mini review. *Molecules*. 2018. 23(8). 2080. DOI: 10.3390/molecules23082080
11. Apoorva OS, Shukla K, Khurana A et al. Proteases: Role in various human diseases. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2025. 26(14). 2257-2269. DOI: 10.2174/0113892010316162240910103659
12. Badouin H, Gouzy J, Grassa C et al. The sunflower genome provides insights into oil metabolism, flowering and Asterid evolution. *Nature*. 2017. 546. 148–152. DOI: 10.1038/nature22380
13. Barker MS, Kane NC, Matvienko M et al. Multiple paleopolyploidizations during the evolution of the Compositae reveal parallel patterns of duplicate gene retention after millions of years. *Mol. Biol. Evol.* 2008. 25(11). 2445-2455. DOI: 10.1093/molbev/msn187
14. Baskova IP, Zavalova LL. Proteinase inhibitors from the medicinal leech *Hirudo medicinalis*. *Biochemistry (Moscow)*. 2001. 66. 703–714. DOI: 10.1023/A:1010223325313
15. Behsaz B, Mohimani H, Gurevich A et al. De novo peptide sequencing reveals many cyclopeptides in the human gut and other environments. *Cell Systems*. 2020. 10(1). 99-108. DOI:10.1016/j.cels.2019.11.007
16. Brady RL, Luckett S, Shewry PR et al. Serine protease inhibitor. (Patent No. PCT/GB99/03945). 1999
17. Brady RL, Shewry PR, Luckett S et al. Peptide inhibitor of Browman-Birk type (Patent No. WO031139A1). 2000 World Intellectual Property Organization.
18. Caceres CC, Bansal PS, Navarro S et al. An engineered cyclic peptide alleviates symptoms of inflammation in a murine model of inflammatory bowel disease. *J. Biol. Chem.* 2017. 292(24). 10288-10294. DOI: 10.1074/jbc.M117.779215
19. Chan LY, Craik DJ, Daly NL. Cyclic thrombospondin-1 mimetics: grafting of a thrombospondin sequence into circular disulfide-rich frameworks to inhibit endothelial cell migration. *Biosci. Rep.* 2015. 35(6) e00270. DOI: 10.1042/BSR20150210
20. Chan LY, Craik DJ, Daly NL. Dual-targeting anti-angiogenic cyclic peptides as potential drug leads for cancer therapy. *Sci Rep.* 2016. 6. 35347. DOI:10.1038/srep35347
21. Chekan JR, Mydy LS, Pasquale MA et al. Plant peptides—redefining an area of ribosomally synthesized

- and post-translationally modified peptides. *Nat. Prod. Rep.* 2024. 41(7). 1020-1059. DOI: 10.1039/D3NP00042G
22. Cid-Gallegos MS, Corzo-Ríos LJ, Jiménez-Martínez C et al. Protease inhibitors from plants as therapeutic agents - a review. *Plant Foods Hum. Nutr.* 2022. 77(1). 20–29. DOI:10.1007/s11130-022-00949-4
23. Clemente M, Corigliano MG, Pariani SA et al. Plant serine protease inhibitors: biotechnology application in agriculture and molecular farming. *Int. J. Mol. Sci.* 2019. 20(6). 1345. DOI: 10.3390/ijms20061345
24. Conners R, Konarev AV, Forsyth J et al. An unusual helix-turn-helix protease inhibitory motif in a novel trypsin inhibitor from seeds of veronica (*Veronica hederifolia* L.). *J. Biol. Chem.* 2007. 282. 27760–27768. DOI: 10.1074/jbc.M703871200
25. Craik DJ, Lee MH, Rehm FB et al. Ribosomally-synthesised cyclic peptides from plants as drug leads and pharmaceutical scaffolds. *Bioorg. Med. Chem.* 2018. 26(10). 2727-2737. DOI:10.1016/j.bmc.2017.08.005
26. Craik DJ, Swedberg JE, Mylne JS et al. Cyclotides as a basis for drug design. *Expert Opin. Drug Discov.* 2012. 7(3). 179-194. DOI: 10.1517/17460441.2012.661554
27. D'Souza C., Henriques S.T., Wang C.K., Cheneval O., Chan L.Y., Bokil N.J., Sweet M.J., Craik D.J. Using the MCoTI-II cyclotide scaffold to design a stable cyclic peptide antagonist of SET, a protein overexpressed in human cancer // *Biochemistry.* 2016. V. 55(2).P. 396–405. DOI:10.1021/acs.biochem.5b00529
28. de Veer SJ, Ukolova SS, Munro CA et al. Mechanism-based selection of a potent kallikrein-related peptidase 7 inhibitor from a versatile library based on the sunflower trypsin inhibitor SFTI-1. *Pept. Sci.* 2013. 100. 510–518. DOI: 10.1002/bip.22231
29. de Veer SJ, White AM, Craik DJ. Sunflower trypsin inhibitor-1 (SFTI-1): Sowing seeds in the fields of chemistry and biology. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2021. 60(15). 8050-8071. DOI: 10.1002/anie.202006919
30. Debreczeni JÉ, Bunkóczy G, Girmann B et al. In-house phase determination of the lima bean trypsin inhibitor: a low-resolution sulfur-SAD case. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2003. 59(2). 393-395. DOI: 10.1107/S09074444902020917
31. Deraison C, Vergnolle N. Proteases in intestinal health and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2026. 23. 6–28. DOI: 10.1038/s41575-025-01129-w
32. Di Cera E. Serine proteases. *IUBMB life.* 2009. 61(5). 510-515. DOI: 10.1002/iub.186
33. Divekar PA, Rani V, Majumder S et al. Protease inhibitors: an induced plant defense mechanism against herbivores. *J. Plant Growth Regul.* 2023. 42(10). 6057-6073. DOI: 10.1007/s00344-022-10767-2
34. Du J, Chan LY, Poth AG et al. Discovery and characterization of cyclic and acyclic trypsin inhibitors from *Momordica dioica*. *J. Nat. Prod.* 2019. 82(2). 293-300. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.8b00716
35. Dubovenko AG, Dunaevsky YE, Belozersky MA et al. Trypsin-like proteins of the fungi as possible markers of pathogenicity. *Fungal biology.* 2010. 114(2-3). 151-159. DOI:10.1016/j.fumbio.2009.11.004
36. Durek T, Kaas Q, White AM et al. Melanocortin 1 receptor agonists based on a bivalent, bicyclic peptide framework. *J. Med. Chem.* 2021. 64(14). 9906-9915. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.1c00095
37. Elliott AG, Delay C, Liu H et al. Evolutionary origins of a bioactive peptide buried within preproalbumin. *Plant Cell.* 2014. 26(3). 981–995. DOI: 10.1105/tpc.114.123620
38. Falanga A, Nigro E, De Biasi MG et al. Cyclic peptides as novel therapeutic microbicides: engineering of human defensin mimetics. *Molecules.* 2017. 22(7). 1217. DOI: 10.3390/molecules22071217
39. Franke B., Mylne J.S., Rosengren K.J. Buried treasure: biosynthesis, structures and applications of cyclic peptides hidden in seed storage albumins // *Nat. Prod. Rep.* 2018. V. 35(2). P. 137-146. DOI: 10.1039/C7NP00066A
40. González-Pérez S. Sunflower proteins. In: E.Martínez-Force, N.T.Dunford, J.J. Salas (Eds) *Sunflower.* 2015. Academic Press and AOC Press. 331-393. DOI: 10.1016/B978-1-893997-94-3.50018-0.
41. Gulya T, Rashid K, Masirevic SM. Sunflower diseases. A.A. Schneiter (Ed.) *Sunflower technology and production.* 1997. V.35. Soil Science Society of America, Inc. 263-379. DOI: 10.2134/agronmonogr35.c6
42. Hashemzaei M, Nimrouzi M, Salehi M et al. Therapeutic potential of Bowman-Birk inhibitors in various disorders: A comprehensive review. *Eur. J. Med. Chem. Rep.* 2025. 15. 100310. DOI: 10.1016/j.ejmcr.2025.100310
43. Hellinger R, Gruber CW. Peptide-based protease inhibitors from plants. *Drug Discov. Today.* 2019. 24(9). 1877-1889. DOI: 10.1016/j.drudis.2019.05.026
44. Helmy NM, Parang, K. Cyclic peptides with antifungal properties derived from bacteria, fungi, plants, and synthetic sources. *Pharmaceuticals.* 2023. 16(6). 892. DOI: 10.3390/ph16060892
45. Hibdige SGS, Raimondeau P, Christin P-A et al. Widespread lateral gene transfer among grasses. *New Phytol.* 2021. 230(6). 2474–2486. DOI: 10.1111/nph.17328
46. James AM, Jayasena AS, Zhang J et al. Evidence for ancient origins of Bowman-Birk inhibitors from *Selaginella moellendorffii*. *The Plant Cell.* 2017. 29(3). 461-473. DOI: 10.1105/tpc.16.00831
47. Jayasena AS, Fisher MF, Panero JL et al. Stepwise evolution of a buried inhibitor peptide over 45 My. *Mol. Biol. Evol.* 2017. 34(6). 1505-1516. DOI: 10.1093/molbev/msx104

48. Jayasena AS, Secco D, Bernath-Levin K et al. Next generation sequencing and de novo transcriptomics to study gene evolution. *Plant Methods*. 2014. 10(1). 34. doi: 10.1186/1746-4811-10-34
49. Kaessmann H. Origins, evolution, and phenotypic impact of new genes. *Genome Research*. 2010. 20(10). 1313-1326. DOI: 10.1101/gr.101386.109
50. Kaiser KP, Bruhn LC, Belitz HD. Protease-inhibitor in potatoes. Protein, trypsin - and chymotrypsin, inhibitor patterns by isoelectric focusig in polyacrylamide. A rapid method for identification of potato varieties. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1974. 154. 339-347. DOI: 10.1007/BF01140819
51. Keeling PJ. Horizontal gene transfer in eukaryotes: aligning theory with data. *Nat. Rev. Genet.* 2024. 25(6). 416-430. DOI: 10.1038/s41576-023-00688-5
52. Kennedy AR. The Bowman-Birk inhibitor from soybeans as an anticarcinogenic agent. *Am. J. Clin. Nutr.* 1998. 68(6). 1406S-1412S. DOI: 10.1093/ajcn/68.6.1406S
53. Kintzing JR, Cochran JR. Engineered knottin peptides as diagnostics, therapeutics, and drug delivery vehicles. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2016. 34. 143–150. DOI: 10.1016/j.cbpa.2016.08.022
54. Konarev A, Anisimova I, GavriloVA V et al. Novel proteinase inhibitors in seeds of sunflower (*Helianthus annuus* L.): polymorphism, inheritance and properties. *Theor. Appl. Genet.* 2000a. 10. 82–88 DOI: 10.1007/s001220050012
55. Konarev AV. Identification of albumin 0.19 in grain protein of cereals. *Cereal Chem.* 1978. 55(6). 927-936.
56. Konarev AV. Interaction of insect digestive enzymes with plant protein inhibitors and host-parasite coevolution. *Euphytica*. 1996. 92. 89–94. DOI: 10.1007/BF00022833
57. Konarev AV, Anisimova IN, GavriloVA VA et al. Serine proteinase inhibitors in the Compositae: distribution, polymorphism and properties. *Phytochemistry*. 2002a. 59(3). 279-291. DOI: 10.1016/S0031-9422(01)00463-0
58. Konarev AV, Anisimova IN, GavriloVA VA et al. Polymorphism of inhibitors of hydrolytic enzymes present in cereal and sunflower seeds. In: Mugnozza, G.T.S., Porceddu, E., Pagnotta, M.A. (eds) Genetics and Breeding for Crop Quality and Resistance. Developments in Plant Breeding. 1999a. Vol. 8. Springer, Dordrecht. DOI: 10.1007/978-94-011-4475-9_16
59. Konarev AV, Griffin J, Konechnaya GY et al. The distribution of serine proteinase inhibitors in seeds of the Asteridae. *Phytochemistry*. 2004. 65(22). 3003-3020. DOI: 10.1016/j.phytochem.2004.08.022
60. Konarev AV, Kochetkov VV, Bailey JA et al. The detection of inhibitors of the *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary extracellular proteinases in sunflower // *J. Phytopathol.* 1999b. V. 147(2). P. 105-108. DOI: 10.1046/j.1439-0434.1999.147002105.x
61. Konarev AV, Lovegrove A. Novel detection methods used in conjunction with affinity chromatography for the identification and purification of hydrolytic enzymes or enzyme inhibitors from insects and plants. In: Magdeldin, S. (Ed.), Affinity Chromatography. InTech. 2012. 188–210. DOI: 10.5772/37618
62. Konarev AV, Tomooka N, Vaughan DA. Proteinase inhibitor polymorphism in the genus *Vigna* subgenus *Ceratotropis* and its biosystematic implications. *Euphytica*. 2002b. 123(2). 165-177. DOI: 10.1023/A:1014920309710
63. Konarev AIV, Anisimova IN, GavriloVA VA et al. Polymorphism of inhibitors of hydrolytic enzymes present in cereal and sunflower seeds. Abst. XV EUCARPIA Congress (20-25 Sept.1998, Viterbo, Italy) "Genetics and breeding for crop quality and resistance". 1998. 34.
64. Konarev AIV. Insect and fungal enzyme inhibitors in study of variability, evolution and resistance of wheat and other Triticeae Dum. cereals. In: P.R. Shewry, A.S. Tatham Eds. Wheat Gluten. Royal Society of Chemistry. 2000b. 526-530. DOI: 10.1039/9781847552372-00526
65. Konarev VG, Gavrilyuk I.P., Gubareva N.K., Peneva T.I., Chmeleva Z.V., Konarev A.V., Akhmetov R.R., Giljazetdinov Sh.Ja., Sidorova V.V. Anisimova IN, Eggi EE et al. Molecular biological aspects of applied botany, genetics and plant breeding. Ed. V.G. Konarev. Series Theoretical basis of breeding. V. 1. St.-Petersburg, VIR. 1996b. 228 P.
66. Korsinczky ML, Schirra HJ, Rosengren KJ et al. Solution structures by 1H NMR of the novel cyclic trypsin inhibitor SFTI-1 from sunflower seeds and an acyclic permutant. *J. Mol. Biol.* 2001. 311(3). 579-591. DOI: 10.1006/jmbi.2001.4887
67. Kreis M, Forde BG, Rahman S et al. Molecular evolution of the seed storage proteins of barley, rye and wheat. *J. Mol. Biol.* 1985. 183(3). 499-502. DOI: 10.1016/0022-2836(85)90017-8
68. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970. 227(5259). 680-685. DOI: 10.1038/227680a0
69. Legowska A, Debowski D, Lesner A et al. Introduction of non-natural amino acid residues into the substrate-specific P1 position of trypsin inhibitor SFTI-1 yields potent chymotrypsin and cathepsin G inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 2009. 17(9). 3302-3307. DOI: 10.1016/j.bmc.2009.03.045
70. Lesner A, Legowska A, Wysocka M et al. Sunflower trypsin inhibitor 1 as a molecular scaffold for drug discovery. *Curr. Pharm. Des.* 2011. 17(38). 4308-4317. DOI: 10.2174/138161211798999393

71. Leung D, Abbenante G, Fairlie D.P. Protease inhibitors: current status and future prospects. *J. Med. Chem.* 2000. 43(3). 305-341. DOI: 10.1021/jm990412m
72. Li CY, De Veer SJ, White AM et al. Amino acid scanning at P5' within the Bowman-Birk inhibitory loop reveals specificity trends for diverse serine proteases. *J. Med. Chem.* 2019. 62(7). 3696-3706. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b00211
73. Li J, Zhang C, Xu X et al. Trypsin inhibitory loop is an excellent lead structure to design serine protease inhibitors and antimicrobial peptides. *FASEB J.* 2007b. 21. 2466–2473. DOI: 10.1096/fj.06-7966com
74. López-Otín C, Bond JS. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *J. Biol. Chem.* 2008. 283(45). 30433-30437. DOI: 10.1074/jbc.R800035200
75. Luckett S, Garcia RS, Barker JJ et al. High-resolution structure of a potent, cyclic proteinase inhibitor from sunflower seeds. *J. Mol. Biol.* 1999. 290(2). 525-533. DOI: 10.1006/jmbi.1999.2891
76. Mah J, Jayarajan V, Huang X et al. LEKTI-grafted sunflower trypsin inhibitor: A potential therapeutic for skin diseases. *J. Med. Chem.* 2025. 68(22). 24127–24135. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5c01912
77. Malik U, Silva ON, Fensterseifer ICM et al. In vivo efficacy of anuran trypsin inhibitory peptides against staphylococcal skin infection and the impact of peptide cyclization. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015. 59(4). 2113-2121. DOI: 10.1128/aac.04324-14
78. MEROPS the Peptidase Database. 2026. <https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/famsum?family=I12> (Accessed 21.02.2026)
79. Monsalve RI, Villalba M, Rico M et al. The 2S albumin proteins. *Eds E.N.C. Mills, P.R. Shewry. Plant Food Allergens.* 2004. Oxford: Blackwell Science. 42-56. DOI: 10.1002/9780470995174.ch3
80. Mosolov VV, Valueva TA. Proteinase inhibitors and their function in plants: a review. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2005. 41. 227–246. DOI: 10.1007/s10438-005-0040-6
81. Muratspahić E, Tomašević N, Koehbach J et al. Design of a stable cyclic peptide analgesic derived from sunflower seeds that targets the κ -opioid receptor for the treatment of chronic abdominal pain. *J. Med. Chem.* 2021. 64(13). 9042-9055. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.1c00158
82. Mylne J. The perfect pill? [Proteinase inhibitors in sunflowers and drug delivery systems.]. *Australasian Science.* 2011a. 32(7). 30–32. doi: 10.3316/informit.645051701812367
83. Mylne JS, Colgrave ML, Daly NL et al. Albumins and their processing machinery are hijacked for cyclic peptides in sunflower. *Nat. Chem. Biol.* 2011b. 7. 257–259. DOI: 10.1038/nchembio.542
84. Mylne JS, Hara-Nishimura I, Rosengren KJ. Seed storage albumins: biosynthesis, trafficking and structures. *Funct. Plant. Biol.* 2014. 41. 671–677. DOI: 10.1071/FP14035
85. Nolde SB, Vassilevski AA, Rogozhin EA et al. Disulfide-stabilized helical hairpin structure and activity of a novel antifungal peptide EcAMP1 from seeds of barnyard grass (*Echinochloa crus-galli*). *J. Biol. Chem.* 2011. 286(28). 25145-25153. DOI: 10.1074/jbc.M110.200378
86. Oparin PB, Mineev KS, Dunaevsky YE et al. Buckwheat trypsin inhibitor with helical hairpin structure belongs to a new family of plant defence peptides. *Biochem. J.* 2012. 446. 69–77. DOI: 10.1042/BJ20120548
87. Pantoja-Uceda D, Bruix M, Santoro J et al. Solution structure of allergenic 2S albumins. *Biochem. Soc. Trans.* 2002. 30(6). 919–924. DOI: 10.1042/bst0300919
88. Philips JG, Martin-Avila E, Robold AV. Horizontal gene transfer from genetically modified plants - Regulatory considerations. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2022. 10. 971402. DOI: 10.3389/fbioe.2022.971402
89. Pitera L, Pitera V. Sunflower protein concentrate in animal nutrition: A Scoping review of nutritional value, processing, and trade. *Acta Univ. Agric. Silv. Mendelianae Brun.* 2025. 73(4-5). 267-277. DOI: 10.11118/actaun.2025.019
90. Poreba M. Recent advances in the development of legumain-selective chemical probes and peptide prodrugs. *Biol. Chem.* 2019. 400(12). 1529-1550. DOI: 10.1515/hsz-2019-0135
91. Qi RF, Song ZW, Chi CW. Structural features and molecular evolution of Bowman-Birk protease inhibitors and their potential application. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 2005. 37(5). 283-292. DOI: 10.1111/j.1745-7270.2005.00048.x
92. Quimbar P, Malik U, Sommerhoff CP et al. High-affinity cyclic peptide matriptase inhibitors. *J. Biol. Chem.* 2013. 288(19). 13885-13896. DOI: 10.1074/jbc.M113.460030
93. Rawlings ND, Barrett AJ, Thomas PD et al. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Res.* 2018. 46(D1). D624-D632. DOI: 10.1093/nar/gkx1134
94. Rezende SB, Cândido ES, Migliolo L et al. Addressing antimicrobial resistance by using macrocyclic peptides. *Aust. J. Chem.* 2025. 78. CH25091. DOI: 10.1071/CH25091
95. Richards TA, Soanes DM, Jones MDM, et al. Horizontal gene transfer facilitated the evolution of plant parasitic mechanisms in the oomycetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011. 108(37). 15258-15263. DOI: 10.1073/pnas.1105100108
96. Richardson M. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. In: Dey P.M., Harborne J.B (Eds.)

- Methods in Plant Biochemistry. 1991. V.5. Academic Press, New York. 259–305. DOI: 10.1271/bbb.60394
97. Riley BT, Ilyichova O, de Veer S, et al. KLK4 inhibition by cyclic and acyclic peptides: structural and dynamical insights into standard-mechanism protease inhibitors. *Biochemistry*. 2019. 58(21). 2524–2533. DOI: 10.1021/acs.biochem.9b00191
98. Ryan CA. Protease inhibitors in plants: genes for improving defense against insects and pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 1990. 28. 25–49. DOI: 10.1146/annurev.py.28.090190.002233
99. Sánchez MA, Strack KN, Mendoza-Morales LF, et al. Kazal-type serine protease inhibitors from *Arabidopsis thaliana* and *Toxoplasma gondii* exhibit antimicrobial activity against plant pathogens. *Sci. Rep.* 2026. 16. 4606. DOI: 10.1038/s41598-025-34654-4
100. Savory F, Leonard G, Richards TA. The role of horizontal gene transfer in the evolution of the oomycetes. *PLoS Pathog.* 2015. 11(5). e1004805. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004805.
101. Shamsi TN, Parveen R, Fatima S. Characterization, biomedical and agricultural applications of protease inhibitors: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* 2016. 1(91). 1120–33. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.02.069
102. Shea Z, Ogando do Granja M, Fletcher EB et al. A review of bioactive compound effects from primary legume protein sources in human and animal health. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2024. 46(5). 4203–4233. DOI: 10.3390/cimb46050257
103. Shirsat H, Datt M, Kale A et al. Plant defense peptides: Exploring the structure–function correlation for potential applications in drug design and therapeutics. *ACS Omega.* 2025. 10(8). 7583–7596. DOI: 10.1021/acscomega.4c11339
104. Soucy S, Huang J, Gogarten J. Horizontal gene transfer: building the web of life. *Nat. Rev. Genet.* 2015. 16. 472–482. DOI: 10.1038/nrg3962
105. Souza PF, Vasconcelos IM, Silva FD et al. A 2S albumin from the seed cake of *Ricinus communis* inhibits trypsin and has strong antibacterial activity against human pathogenic bacteria. *J. Nat. Prod.* 2016. 79(10). 2423–2431. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b01096
106. Sreerama YN, Gowda LR. Antigenic determinants and reactive sites of a trypsin/chymotrypsin double-headed inhibitor from horse gram (*Dolichos biflorus*). *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1997. 1343(2). 235–242. DOI:10.1016/S0167-4838(97)00117-9
107. Srikanth S, Chen Z. Plant protease inhibitors in therapeutics-focus on cancer therapy. *Front. Pharmacol.* 2016. 7. 470. DOI: 10.3389/fphar.2016.00470
108. Staton SE, Bakken BH, Blackman BK et al. The sunflower (*Helianthus annuus* L.) genome reflects a recent history of biased accumulation of transposable elements. *Plant J.* 2012. 72(1). 142–153. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2012.05072.x
109. Swedberg JE Li CY, de Veer SJ et al. Design of potent and selective cathepsin G inhibitors based on the sunflower trypsin inhibitor-1 scaffold. *J. Med. Chem.* 2017. 60(2). 658–67. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b01509
110. Tan NH, Zhou J. Plant cyclopeptides. *Chem. Rev.*, 2006. 106(3). 840–895. DOI: 10.1021/cr040699h
111. Thewissen BG, Pauly A, Celus I et al. Inhibition of angiotensin I-converting enzyme by wheat gliadin hydrolysates. *Food Chem.* 2011. 127(4). 1653–1658. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.11.171
112. Tian M, Benedetti B, Kamoun S. A Second Kazal-like protease inhibitor from *Phytophthora infestans* inhibits and interacts with the apoplastic pathogenesis-related protease P69B of tomato. *Plant Physiol.* 2005a. 38(3). 1785–93. DOI: 10.1104/pp.105.061226.
113. Tian M, Kamoun S. A two disulfide bridge Kazal domain from *Phytophthora* exhibits stable inhibitory activity against serine proteases of the subtilisin family. *BMC Biochem.* 2005b. 6. 15. DOI: 10.1186/1471-2091-6-15
114. Ventimiglia M, Marturano G, Vangelisti A et al. Genome-wide identification and characterization of exapted transposable elements in the large genome of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant J.* 2023. 113(4). 734–748. DOI: 10.1111/tpj.16078
115. Vidmar R, Vizovisek M, Turk D et al. Protease cleavage site fingerprinting by label-free in-gel degradomics reveals pH-dependent specificity switch of legumain. *EMBO J.* 2017. 36. 2455–2465. DOI: 10.15252/embj.201796750
116. Wang CK, Northfield SE, Huang YH et al. Inhibition of tau aggregation using a naturally-occurring cyclic peptide scaffold. *Eur. J. Med. Chem.* 2016. 109. 342–349. DOI: 10.1016/j.ejmech.2016.01.006
117. Wang Y, Govers F, Wang Y. Oomycete plant pathogens: biology, pathogenesis and emerging control strategies. *Nat. Rev. Microbiol.* 2025. DOI: 10.1038/s41579-025-01248-w
118. Wei Y, Huang M, Jiang L. Advancements in serine protease inhibitors: From mechanistic insights to clinical applications. *Catalysts.* 2024. 14(11). 787. DOI: 10.3390/catal14110787
119. Yamada K, Shimada T, Kondo M et al. Multiple functional proteins are produced by cleaving Asn-Gln bonds of a single precursor by vacuolar processing enzyme. *J. Biol. Chem.* 1999. 274(4). 2563–2570. DOI: 10.1074/jbc.274.4.2563
120. Yang J, Tong C, Qi J et al. Engineering and structural insights of a novel BBI-like protease inhibitor livisin from the frog skin secretion. *Toxins.* 2022. 14(4). 273. DOI: 10.3390/toxins14040273

121. Yoshida S, Kim S, Wafula EK et al. Genome sequence of *Striga asiatica* provides insight into the evolution of plant parasitism. *Curr. Biol.* 2019. 29(18). 3041-3052. DOI: 10.1016/j.cub.2019.07.086
122. Zhang Y, Fernandez-Aparicio M, Wafula EK et al. Evolution of a horizontally acquired legume gene, albumin 1, in the parasitic plant *Phelipanche aegyptiaca* and related species. *BMC Evol. Biol.* 2013. 13(48). DOI: 10.1186/1471-2148-13-48

References

1. Abdalla MA, McGaw LJ. Natural cyclic peptides as an attractive modality for therapeutics: A mini review. *Molecules.* 2018. 23(8). 2080. DOI: 10.3390/molecules23082080
2. Anisimova IN, Alpatieva NV, Goryunova SV et al. Structural variability of sunflower gene for methionine-rich albumin SFA8. *Proceedings on applied botany, genetics and breeding.* 2018. 179(4). 91-103. doi: 10.30901/2227-8834-2018-4-91-103 (In Russian)
3. Apoorva OS, Shukla K, Khurana A et al. Proteases: Role in various human diseases. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2025. 26(14). 2257-2269. DOI: 10.2174/0113892010316162240910103659
4. Badouin H, Gouzy J, Grassa C et al. The sunflower genome provides insights into oil metabolism, flowering and Asterid evolution. *Nature.* 2017. 546. 148–152. DOI: 10.1038/nature22380
5. Barker MS, Kane NC, Matvienko M et al. Multiple paleopolyploidizations during the evolution of the Compositae reveal parallel patterns of duplicate gene retention after millions of years. *Mol. Biol. Evol.* 2008. 25(11). 2445-2455. DOI: 10.1093/molbev/msn187
6. Baskova IP, Zavalova LL. Proteinase inhibitors from the medicinal leech *Hirudo medicinalis*. *Biochemistry (Moscow).* 2001. 66. 703–714. DOI: 10.1023/A:1010223325313
7. Behsaz B, Mohimani H, Gurevich A et al. De novo peptide sequencing reveals many cyclopeptides in the human gut and other environments. *Cell Systems.* 2020. 10(1). 99-108. DOI:10.1016/j.cels.2019.11.007
8. Brady RL, Luckett S, Shewry PR et al. Serine protease inhibitor. (Patent No. PCT/GB99/03945). 1999
9. Brady RL, Shewry PR, Luckett S et al. Peptide inhibitor of Browman-Birk type (Patent No. WO031139A1). 2000 World Intellectual Property Organization.
10. Caceres CC, Bansal PS, Navarro S et al. An engineered cyclic peptide alleviates symptoms of inflammation in a murine model of inflammatory bowel disease. *J. Biol. Chem.* 2017. 292(24). 10288-10294. DOI: 10.1074/jbc.M117.779215
11. Chan LY, Craik DJ, Daly NL. Cyclic thrombospondin-1 mimetics: grafting of a thrombospondin sequence into circular disulfide-rich frameworks to inhibit endothelial cell migration. *Biosci. Rep.* 2015. 35(6) e00270. DOI: 10.1042/BSR20150210
12. Chan LY, Craik DJ, Daly NL. Dual-targeting anti-angiogenic cyclic peptides as potential drug leads for cancer therapy. *Sci Rep.* 2016. 6. 35347. DOI:10.1038/srep35347
13. Chekan JR, Mydy LS, Pasquale MA et al. Plant peptides—redefining an area of ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides. *Nat. Prod.Rep.* 2024. 41(7). 1020-1059. DOI: 10.1039/D3NP00042G
14. Cid-Gallegos MS, Corzo-Rios LJ, Jiménez-Martínez C et al. Protease inhibitors from plants as therapeutic agents - a review. *Plant Foods Hum. Nutr.* 2022. 77(1). 20–29. DOI:10.1007/s11130-022-00949-4
15. Clemente M, Corigliano MG, Pariani SA et al. Plant serine protease inhibitors: biotechnology application in agriculture and molecular farming. *Int. J. Mol. Sci.* 2019. 20(6). 1345. DOI: 10.3390/ijms20061345
16. Connors R, Konarev AV, Forsyth J et al. An unusual helix-turn-helix protease inhibitory motif in a novel trypsin inhibitor from seeds of veronica (*Veronica hederifolia* L.). *J. Biol. Chem.* 2007. 282. 27760–27768. DOI: 10.1074/jbc.M703871200
17. Craik DJ, Lee MH, Rehm FB et al. Ribosomally-synthesised cyclic peptides from plants as drug leads and pharmaceutical scaffolds. *Bioorg. Med. Chem.* 2018. 26(10). 2727-2737. DOI:10.1016/j.bmc.2017.08.005
18. Craik DJ, Swedberg JE, Mylne JS et al. Cyclotides as a basis for drug design. *Expert Opin. Drug Discov.* 2012. 7(3). 179-194. DOI: 10.1517/17460441.2012.661554
19. D'Souza C., Henriques S.T., Wang C.K., Cheneval O., Chan L.Y., Bokil N.J., Sweet M.J., Craik D.J. Using the MCoTI-II cyclotide scaffold to design a stable cyclic peptide antagonist of SET, a protein overexpressed in human cancer // *Biochemistry.* 2016. V. 55(2).P. 396–405. DOI:10.1021/acs.biochem.5b00529
20. de Veer SJ, Ukolova SS, Munro CA et al. Mechanism-based selection of a potent kallikrein-related peptidase 7 inhibitor from a versatile library based on the sunflower trypsin inhibitor SFTI-1. *Pept. Sci.* 2013. 100. 510–518. DOI: 10.1002/bip.22231
21. de Veer SJ, White AM, Craik DJ. Sunflower trypsin inhibitor-1 (SFTI-1): Sowing seeds in the fields of chemistry and biology. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2021. 60(15). 8050-8071. DOI: 10.1002/anie.202006919
22. Debreczeni JÉ, Bunkóczy G, Girmann B et al. In-house phase determination of the lima bean trypsin inhibitor: a low-resolution sulfur-SAD case. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2003. 59(2). 393-395. DOI: 10.1107/S0907444902020917
23. Deraison C, Vergnolle N. Proteases in intestinal health and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2026. 23. 6–28. DOI: 10.1038/s41575-025-01129-w

24. Di Cera E. Serine proteases. *IUBMB life*. 2009. 61(5). 510-515. DOI: 10.1002/iub.186
25. Divekar PA, Rani V, Majumder S et al. Protease inhibitors: an induced plant defense mechanism against herbivores. *J. Plant Growth Regul.* 2023. 42(10). 6057-6073. DOI: 10.1007/s00344-022-10767-2
26. Du J, Chan LY, Poth AG et al. Discovery and characterization of cyclic and acyclic trypsin inhibitors from *Momordica dioica*. *J. Nat. Prod.* 2019. 82(2). 293-300. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.8b00716
27. Dubovenko AG, Dunaevsky YE, Belozersky MA et al. Trypsin-like proteins of the fungi as possible markers of pathogenicity. *Fungal biology*. 2010. 114(2-3). 151-159. DOI:10.1016/j.funbio.2009.11.004
28. Durek T, Kaas Q, White AM et al. Melanocortin 1 receptor agonists based on a bivalent, bicyclic peptide framework. *J. Med. Chem.* 2021. 64(14). 9906-9915. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.1c00095
29. Elliott AG, Delay C, Liu H et al. Evolutionary origins of a bioactive peptide buried within preproalbumin. *Plant Cell*. 2014. 26(3). 981-995. DOI: 10.1105/tpc.114.123620
30. Falanga A, Nigro E, De Biasi MG et al. Cyclic peptides as novel therapeutic microbicides: engineering of human defensin mimetics. *Molecules*. 2017. 22(7). 1217. DOI: 10.3390/molecules22071217
31. Franke B., Mylne J.S., Rosengren K.J. Buried treasure: biosynthesis, structures and applications of cyclic peptides hidden in seed storage albumins // *Nat. Prod. Rep.* 2018. V. 35(2). P. 137-146. DOI: 10.1039/C7NP00066A
32. González-Pérez S. Sunflower proteins. In: E.Martínez-Force, N.T.Dunford, J.J. Salas (Eds) *Sunflower*. 2015. Academic Press and AOCs Press. 331-393. DOI: 10.1016/B978-1-893997-94-3.50018-0.
33. Gulya T, Rashid K, Masirevic SM. Sunflower diseases. A.A. Schneiter (Ed.) *Sunflower technology and production*. 1997. V.35. Soil Science Society of America, Inc. 263-379. DOI: 10.2134/agronmonogr35.c6
34. Hashemzadeh M, Nimrouzi M, Salehi M et al. Therapeutic potential of Bowman-Birk inhibitors in various disorders: A comprehensive review. *Eur. J. Med. Chem. Rep.* 2025. 15. 100310. DOI: 10.1016/j.ejmcr.2025.100310
35. Hellinger R, Gruber CW. Peptide-based protease inhibitors from plants. *Drug Discov. Today*. 2019. 24(9). 1877-1889. DOI: 10.1016/j.drudis.2019.05.026
36. Helmy NM, Parang, K. Cyclic peptides with antifungal properties derived from bacteria, fungi, plants, and synthetic sources. *Pharmaceuticals*. 2023. 16(6). 892. DOI: 10.3390/ph16060892
37. Hibdige SGS, Raimondeau P, Christin P-A et al. Widespread lateral gene transfer among grasses. *New Phytol.* 2021. 230(6). 2474-2486. DOI: 10.1111/nph.17328
38. James AM, Jayasena AS, Zhang J et al. Evidence for ancient origins of Bowman-Birk inhibitors from *Selaginella moellendorffii*. *The Plant Cell*. 2017. 29(3). 461-473. DOI: 10.1105/tpc.16.00831
39. Jayasena AS, Fisher MF, Panero JL et al. Stepwise evolution of a buried inhibitor peptide over 45 My. *Mol. Biol. Evol.* 2017. 34(6). 1505-1516. DOI: 10.1093/molbev/msx104
40. Jayasena AS, Secco D, Bernath-Levin K et al. Next generation sequencing and de novo transcriptomics to study gene evolution. *Plant Methods*. 2014. 10(1). 34. doi: 10.1186/1746-4811-10-34
41. Kaessmann H. Origins, evolution, and phenotypic impact of new genes. *Genome Research*. 2010. 20(10). 1313-1326. DOI: 10.1101/gr.101386.109
42. Kaiser KP, Bruhn LC, Belitz HD. Protease-inhibitor in potatoes. Protein, trypsin - and chymotrypsin, inhibitor patterns by isoelectric focusing in polyacrylamide. A rapid method for identification of potato varieties. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1974. 154. 339-347. DOI: 10.1007/BF01140819
43. Keeling PJ. Horizontal gene transfer in eukaryotes: aligning theory with data. *Nat. Rev. Genet.* 2024. 25(6). 416-430. DOI: 10.1038/s41576-023-00688-5
44. Kennedy AR. The Bowman-Birk inhibitor from soybeans as an anticarcinogenic agent. *Am. J. Clin. Nutr.* 1998. 68(6). 1406S-1412S. DOI: 10.1093/ajcn/68.6.1406S
45. Kintzing JR, Cochran JR. Engineered knottin peptides as diagnostics, therapeutics, and drug delivery vehicles. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2016. 34. 143-150. DOI: 10.1016/j.cbpa.2016.08.022
46. Konarev A, Anisimova I, Gavrilova V et al. Novel proteinase inhibitors in seeds of sunflower (*Helianthus annuus* L.): polymorphism, inheritance and properties. *Theor. Appl. Genet.* 2000a. 10. 82-88 DOI: 10.1007/s001220050012
47. Konarev AV. Component composition and genetic control of insect α -amylase inhibitors from wheat and aegilops grains. VASKHNIL Proceed. 1982. 6. 42-44. (In Russian)
48. Konarev AV. Identification of albumin 0.19 in grain protein of cereals. *Cereal Chem.* 1978. 55(6). 927-936.
49. Konarev AV. Interaction of insect digestive enzymes with plant protein inhibitors and host-parasite coevolution. *Euphytica*. 1996. 92. 89-94. DOI: 10.1007/BF00022833
50. Konarev A.V. Molecular aspects of plant immunity and their coevolution with insects. *Biosfera*. 2017. 9(1). 79-99. doi: 10.24855/biosfera.v9i1.325 (In Russian)
51. Konarev AV, Griffin J, Konechnaya GY et al. The distribution of serine proteinase inhibitors in seeds of

- the Asteridae. *Phytochemistry*. 2004. 65(22). 3003-3020. DOI: 10.1016/j.phytochem.2004.08.022
52. Konarev AV, Kochetkov VV, Bailey JA et al. The detection of inhibitors of the *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary extracellular proteinases in sunflower // *J. Phytopathol.* 1999b. V. 147(2). P. 105-108. DOI: 10.1046/j.1439-0434.1999.147002105.x
53. Konarev AV, Lovegrove A. Novel detection methods used in conjunction with affinity chromatography for the identification and purification of hydrolytic enzymes or enzyme inhibitors from insects and plants. In: Magdeldin, S. (Ed.), *Affinity Chromatography*. InTech. 2012. 188–210. DOI: 10.5772/37618
54. Konarev AV, Tomooka N, Vaughan DA. Proteinase inhibitor polymorphism in the genus *Vigna* subgenus *Ceratotropis* and its biosystematic implications. *Euphytica*. 2002b. 123(2). 165-177. DOI: 10.1023/A:1014920309710
55. Konarev AV, Anisimova IN, Gavrilova VA et al. Serine proteinase inhibitors in the Compositae: distribution, polymorphism and properties. *Phytochemistry*. 2002a. 59(3). 279-291. DOI: 10.1016/S0031-9422(01)00463-0
56. Konarev AV, Anisimova IN, Gavrilova VA et al. Polymorphism of inhibitors of hydrolytic enzymes present in cereal and sunflower seeds. In: Mugnozza, G.T.S., Porceddu, E., Pagnotta, M.A. (eds) *Genetics and Breeding for Crop Quality and Resistance*. Developments in Plant Breeding. 1999a. Vol. 8. Springer, Dordrecht. DOI: 10.1007/978-94-011-4475-9_16
57. Konarev AIV. Hydrolase inhibitors in the study of the gene pool of wheat and related cereals. Collection of scientific papers on the bot. gen. and select. VIR. 1987. 114. 34-47. (In Russian)
58. Konarev AIV. Protein inhibitors of hydrolases in plant defense mechanisms. In: *Plant protection in the context of the reform of the agro-industrial complex: economics, efficiency, environmental friendliness*. Tez. dokl. All-Russian Scientific Research Institute of Plant Protection. 1995. 205-206. (In Russian)
59. Konarev AIV. Study of proteinase inhibitors from wheat grain by the gelatine replica method. *Biochemistry (Moscow)*. 1986. 51(2). 195-201. (In Russian)
60. Konarev AIV, Fomicheva YuV. The «Cross» analysis of interaction of insect α -amylase and proteinase components with protein inhibitors from wheat endosperm. *Biochemistry (Moscow)*. 1991. 56(4). 628-638. (In Russian)
61. Konarev AIV. Insect and fungal enzyme inhibitors in study of variability, evolution and resistance of wheat and other Triticeae Dum. cereals. In: P.R. Shewry, A.S. Tatham Eds. *Wheat Gluten*. Royal Society of Chemistry. 2000b. 526-530. DOI: 10.1039/9781847552372-00526
62. Konarev AIV, Anisimova IN, Gavrilova VA et al. Polymorphism of inhibitors of hydrolytic enzymes present in cereal and sunflower seeds. Abst. XV EUCARPIA Congress (20-25 Sept.1998, Viterbo, Italy) "Genetics and breeding for crop quality and resistance". 1998. 34.
63. Konarev VG, Gavriluk IP, Gubareva NK et al. Edited by V.G.Konarev. Identification of varieties and registration of the gene pool of cultivated plants by seed proteins. 2000c. St. Petersburg: VIR. 2000. 186 p. (In Russian)
64. Konarev VG, Gavriluk I.P., Gubareva N.K., Peneva T.I., Chmeleva Z.V., Konarev A.V., Akhmetov R.R., Giljazetdinov Sh.Ja., Sidorova V.V. Anisimova IN, Eggi EE et al. Molecular biological aspects of applied botany, genetics and plant breeding. Ed. V.G. Konarev. Series Theoretical basis of breeding. V. 1. St.-Petersburg, VIR. 1996b. 228 P.
65. Korsinczky ML, Schirra HJ, Rosengren KJ et al. Solution structures by 1H NMR of the novel cyclic trypsin inhibitor SFTI-1 from sunflower seeds and an acyclic permutant. *J. Mol. Biol.* 2001. 311(3). 579-591. DOI: 10.1006/jmbi.2001.4887
66. Kreis M, Forde BG, Rahman S et al. Molecular evolution of the seed storage proteins of barley, rye and wheat. *J. Mol. Biol.* 1985. 183(3). 499-502. DOI: 10.1016/0022-2836(85)90017-8
67. Kuznetsova SS, Kolesanova EF, Talanova AV et al. Prospects for the design of new therapeutically significant protease inhibitors based on knottins & sunflower seed trypsin inhibitor (SFTI 1). *Biomeditsinskaya Khimiya*. 2016. 62(4). 353-368. DOI: 10.18097/pbmc20166204353
68. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970. 227(5259). 680-685. DOI: 10.1038/227680a0
69. Legowska A, Debowski D, Lesner A et al. Introduction of non-natural amino acid residues into the substrate-specific P1 position of trypsin inhibitor SFTI-1 yields potent chymotrypsin and cathepsin G inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 2009. 17(9). 3302-3307. DOI: 10.1016/j.bmc.2009.03.045
70. Lesner A, Legowska A, Wysocka M et al. Sunflower trypsin inhibitor 1 as a molecular scaffold for drug discovery. *Curr. Pharm. Des.* 2011. 17(38). 4308-4317. DOI: 10.2174/138161211798999393
71. Leung D, Abbenante G, Fairlie D.P. Protease inhibitors: current status and future prospects. *J. Med. Chem.* 2000. 43(3). 305-341. DOI: 10.1021/jm990412m
72. Li CY, De Veer SJ, White AM et al. Amino acid scanning at P5' within the Bowman-Birk inhibitory loop reveals specificity trends for diverse serine proteases. *J. Med. Chem.* 2019. 62(7). 3696-3706. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b00211

73. Li J, Zhang C, Xu X et al. Trypsin inhibitory loop is an excellent lead structure to design serine protease inhibitors and antimicrobial peptides. *FASEB J.* 2007b. 21. 2466–2473. DOI: 10.1096/fj.06-7966com
74. López-Otín C, Bond JS. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *J. Biol. Chem.* 2008. 283(45). 30433-30437. DOI: 10.1074/jbc.R800035200
75. Luckett S, Garcia RS, Barker JJ et al. High-resolution structure of a potent, cyclic proteinase inhibitor from sunflower seeds. *J. Mol. Biol.* 1999. 290(2). 525-533. DOI: 10.1006/jmbi.1999.2891
76. Mah J, Jayarajan V, Huang X et al. LEKTI-grafted sunflower trypsin inhibitor: A potential therapeutic for skin diseases. *J. Med. Chem.* 2025. 68(22). 24127–24135. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5c01912
77. Malik U, Silva ON, Fensterseifer ICM et al. In vivo efficacy of anuran trypsin inhibitory peptides against staphylococcal skin infection and the impact of peptide cyclization. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015. 59(4). 2113-2121. DOI: 10.1128/aac.04324-14
78. MEROPS the Peptidase Database. 2026. <https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/famsum?family=I12> (Accessed 21.02.2026)
79. Monsalve RI, Villalba M, Rico M et al. The 2S albumin proteins. *Eds E.N.C. Mills, P.R. Shewry. Plant Food Allergens.* 2004. Oxford: Blackwell Science. 42-56. DOI: 10.1002/9780470995174.ch3
80. Mosolov VV, Valueva TA. Proteinase inhibitors and their function in plants: a review. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2005. 41. 227–246. DOI: 10.1007/s10438-005-0040-6
81. Muratspahić E, Tomašević N, Koehbach J et al. Design of a stable cyclic peptide analgesic derived from sunflower seeds that targets the κ -opioid receptor for the treatment of chronic abdominal pain. *J. Med. Chem.* 2021. 64(13). 9042-9055. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.1c00158
82. Mylne J. The perfect pill? [Proteinase inhibitors in sunflowers and drug delivery systems.]. *Australasian Science.* 2011a. 32(7). 30–32. doi: 10.3316/informit.645051701812367
83. Mylne JS, Colgrave ML, Daly NL et al. Albumins and their processing machinery are hijacked for cyclic peptides in sunflower. *Nat. Chem. Biol.* 2011b. 7. 257–259. DOI: 10.1038/nchembio.542
84. Mylne JS, Hara-Nishimura I, Rosengren KJ. Seed storage albumins: biosynthesis, trafficking and structures. *Funct. Plant. Biol.* 2014. 41. 671–677. DOI: 10.1071/FP14035
85. Nolde SB, Vassilevski AA, Rogozhin EA et al. Disulfide-stabilized helical hairpin structure and activity of a novel antifungal peptide EcAMP1 from seeds of barnyard grass (*Echinochloa crus-galli*). *J. Biol. Chem.* 2011. 286(28). 25145-25153. DOI: 10.1074/jbc.M110.200378
86. Oparin PB, Mineev KS, Dunaevsky YE et al. Buckwheat trypsin inhibitor with helical hairpin structure belongs to a new family of plant defence peptides. *Biochem. J.* 2012. 446. 69–77. DOI: 10.1042/BJ20120548
87. Pantoja-Uceda D, Bruix M, Santoro J et al. Solution structure of allergenic 2S albumins. *Biochem. Soc. Trans.* 2002. 30(6). 919–924. DOI: 10.1042/bst0300919
88. Philips JG, Martin-Avila E, Robold AV. Horizontal gene transfer from genetically modified plants - Regulatory considerations. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2022. 10. 971402. DOI: 10.3389/fbioe.2022.971402
89. Pitera L, Pitera V. Sunflower protein concentrate in animal nutrition: A Scoping review of nutritional value, processing, and trade. *Acta Univ. Agric. Silvic. Mendelianae Brun.* 2025. 73(4-5). 267-277. DOI: 10.11118/actaun.2025.019
90. Poreba M. Recent advances in the development of legumain-selective chemical probes and peptide prodrugs. *Biol. Chem.* 2019. 400(12). 1529-1550. DOI: 10.1515/hsz-2019-0135
91. Qi RF, Song ZW, Chi CW. Structural features and molecular evolution of Bowman-Birk protease inhibitors and their potential application. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 2005. 37(5). 283-292. DOI: 10.1111/j.1745-7270.2005.00048.x
92. Quimbar P, Malik U, Sommerhoff CP et al. High-affinity cyclic peptide matriptase inhibitors. *J. Biol. Chem.* 2013. 288(19). 13885-13896. DOI: 10.1074/jbc.M113.460030
93. Rawlings ND, Barrett AJ, Thomas PD et al. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Res.* 2018. 46(D1). D624-D632. DOI: 10.1093/nar/gkx1134
94. Rezende SB, Cândido ES, Migliolo L et al. Addressing antimicrobial resistance by using macrocyclic peptides. *Aust. J. Chem.* 2025. 78. CH25091. DOI: 10.1071/CH25091
95. Richards TA, Soanes DM, Jones MDM, et al. Horizontal gene transfer facilitated the evolution of plant parasitic mechanisms in the oomycetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011. 108(37). 15258-15263. DOI: 10.1073/pnas.1105100108
96. Richardson M. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. In: Dey P.M., Harborne J.B (Eds.) *Methods in Plant Biochemistry.* 1991. V.5. Academic Press, New York. 259–305. DOI: 10.1271/bbb.60394
97. Riley BT, Ilyichova O, de Veer S, et al. KLK4 inhibition by cyclic and acyclic peptides: structural and dynamical insights into standard-mechanism protease inhibitors. *Biochemistry.* 2019. 58(21). 2524–2533. DOI: 10.1021/acs.biochem.9b00191
98. Ryan CA. Protease inhibitors in plants: genes for improving defense against insects and pathogens. *Annu.*

- Rev. *Phytopathol.* 1990. 28. 25-49. DOI: 10.1146/annurev.py.28.090190.002233
99. Sánchez MA, Strack KN, Mendoza-Morales LF, et al. Kazal-type serine protease inhibitors from *Arabidopsis thaliana* and *Toxoplasma gondii* exhibit antimicrobial activity against plant pathogens. *Sci. Rep.* 2026. 16. 4606. DOI: 10.1038/s41598-025-34654-4
100. Savory F, Leonard G, Richards TA. The role of horizontal gene transfer in the evolution of the oomycetes. *PLoS Pathog.* 2015. 11(5). e1004805. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004805.
101. Shamsi TN, Parveen R, Fatima S. Characterization, biomedical and agricultural applications of protease inhibitors: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* 2016. 1(91). 1120-33. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.02.069
102. Shea Z, Ogando do Granja M, Fletcher EB et al. A review of bioactive compound effects from primary legume protein sources in human and animal health. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2024. 46(5). 4203-4233. DOI: 10.3390/cimb46050257
103. Shirsat H, Datt M, Kale A et al. Plant defense peptides: Exploring the structure–function correlation for potential applications in drug design and therapeutics. *ACS Omega.* 2025. 10(8). 7583-7596. DOI: 10.1021/acsomega.4c11339
104. Soucy S, Huang J, Gogarten J. Horizontal gene transfer: building the web of life. *Nat. Rev. Genet.* 2015. 16. 472–482. DOI: 10.1038/nrg3962
105. Souza PF, Vasconcelos IM, Silva FD et al. A 2S albumin from the seed cake of *Ricinus communis* inhibits trypsin and has strong antibacterial activity against human pathogenic bacteria. *J. Nat. Prod.* 2016. 79(10). 2423-2431. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b01096
106. Sreerama YN, Gowda LR. Antigenic determinants and reactive sites of a trypsin/chymotrypsin double-headed inhibitor from horse gram (*Dolichos biflorus*). *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1997. 1343(2). 235-242. DOI:10.1016/S0167-4838(97)00117-9
107. Srikanth S, Chen Z. Plant protease inhibitors in therapeutics-focus on cancer therapy. *Front. Pharmacol.* 2016. 7. 470. DOI: 10.3389/fphar.2016.00470
108. Staton SE, Bakken BH, Blackman BK et al. The sunflower (*Helianthus annuus* L.) genome reflects a recent history of biased accumulation of transposable elements. *Plant J.* 2012. 72(1). 142-153. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2012.05072.x
109. Swedberg JE, Li CY, de Veer SJ et al. Design of potent and selective cathepsin G inhibitors based on the sunflower trypsin inhibitor-1 scaffold. *J. Med. Chem.* 2017. 60(2). 658-67. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b01509
110. Tan NH, Zhou J. Plant cyclopeptides. *Chem. Rev.*, 2006. 106(3). 840-895. DOI: 10.1021/cr040699h
111. Thewissen BG, Pauly A, Celus I et al. Inhibition of angiotensin I-converting enzyme by wheat gliadin hydrolysates. *Food Chem.* 2011. 127(4). 1653-1658. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.11.171
112. Tian M, Benedetti B, Kamoun S. A Second Kazal-like protease inhibitor from *Phytophthora infestans* inhibits and interacts with the apoplastic pathogenesis-related protease P69B of tomato. *Plant Physiol.* 2005a. 38(3). 1785-93. DOI: 10.1104/pp.105.061226.
113. Tian M, Kamoun S. A two disulfide bridge Kazal domain from *Phytophthora* exhibits stable inhibitory activity against serine proteases of the subtilisin family. *BMC Biochem.* 2005b. 6. 15. DOI: 10.1186/1471-2091-6-15
114. Ventimiglia M, Marturano G, Vangelisti A et al. Genome-wide identification and characterization of exapted transposable elements in the large genome of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant J.* 2023. 113(4). 734-748. DOI: 10.1111/tpj.16078
115. Vidmar R, Vizovisek M, Turk D et al. Protease cleavage site fingerprinting by label-free in-gel degradomics reveals pH-dependent specificity switch of legumain. *EMBO J.* 2017. 36. 2455–2465. DOI: 10.15252/embj.201796750
116. Wang CK, Northfield SE, Huang YH et al. Inhibition of tau aggregation using a naturally-occurring cyclic peptide scaffold. *Eur. J. Med. Chem.* 2016. 109. 342–349. DOI: 10.1016/j.ejmech.2016.01.006
117. Wang Y, Govers F, Wang Y. Oomycete plant pathogens: biology, pathogenesis and emerging control strategies. *Nat. Rev. Microbiol.* 2025. DOI: 10.1038/s41579-025-01248-w
118. Wei Y, Huang M, Jiang L. Advancements in serine protease inhibitors: From mechanistic insights to clinical applications. *Catalysts.* 2024. 14(11). 787. DOI: 10.3390/catal14110787
119. Yamada K, Shimada T, Kondo M et al. Multiple functional proteins are produced by cleaving Asn-Gln bonds of a single precursor by vacuolar processing enzyme. *J. Biol. Chem.* 1999. 274(4). 2563-2570. DOI: 10.1074/jbc.274.4.2563
120. Yang J, Tong C, Qi J et al. Engineering and structural insights of a novel BBI-like protease inhibitor livisin from the frog skin secretion. *Toxins.* 2022. 14(4). 273. DOI: 10.3390/toxins14040273
121. Yoshida S, Kim S, Wafula EK et al. Genome sequence of *Striga asiatica* provides insight into the evolution of plant parasitism. *Curr. Biol.* 2019. 29(18). 3041-3052. DOI: 10.1016/j.cub.2019.07.086
122. Zhang Y, Fernandez-Aparicio M, Wafula EK et al. Evolution of a horizontally acquired legume gene, albumin 1, in the parasitic plant *Phelipanche aegyptiaca* and related species. *BMC Evol. Biol.* 2013. 13(48). DOI: 10.1186/1471-2148-13-48