



УДК 577.152.31*236.04 : 577.213.7

ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ РЕСТРИКЦИИ *Vam*HI С ОЛИГОДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДАМИ*

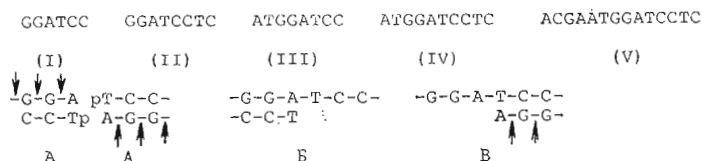
Титеева Г. Р., Виноградов С. В., Берлин Ю. А.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Изучено взаимодействие эндонуклеазы рестрикции *Vam*HI с серией синтетических олигодезоксинуклеотидов длиной 6—14 звеньев, содержащих участок узнавания этой рестриктазы. Оказалось, что фермент специфически расщепляет участок узнавания как таковой (в виде соответствующего гексануклеотида (I)) и в составе несомокомплементарных дека- и окталануклеотидов (II) — (IV). Зависимость эффективности расщепления от структуры субстрата свидетельствует о том, что с *Vam*HI реагирует дуплексная структура, причем фермент играет существенную роль в ее стабилизации. При действии на тетрадекануклеотид (V) *Vam*HI расщепляет неканонический половинный сайт GAA с образованием 5'-концевого три- (а не гепта-) нуклеотида. Обсуждается возможный механизм такого расщепления, основанный на представлениях о роли высших структур ДНК во взаимодействии с эндонуклеазами рестрикции.

Постоянно возрастающий интерес к эндонуклеазам рестрикции [2] связан не только с их исключительной ролью в качестве инструментов исследования ДНК, но и с тем, что эти небольшие и, по-видимому, относительно простые по структуре ферменты могут быть важным источником информации при изучении механизмов специфического взаимодействия белков и нуклеиновых кислот. Одно из направлений в исследовании рестриктаз состоит в выяснении структурных требований этих ферментов к субстратам. Удобными объектами таких исследований служат синтетические олигонуклеотиды, позволяющие направленно и в широких пределах варьировать структуру субстрата [3—10].

Для изучения механизма действия эндонуклеазы рестрикции *Vam*HI и условий ее взаимодействия с одноцепочечными и дуплексными ДНК мы синтезировали ряд олигодезоксинуклеотидов (I) — (V), содержащих *Vam*HI-сайт и комплементарных одноцепочечной ДНК фага M13 в районе этого сайта. Все они были получены фосфотриэфирным методом в растворе исходя из 3'-(*n*-хлорфенил)-фосфатов N-защищенных нуклеозидов с триизопропилбензолсульфонилтетразолом в качестве конденсирующего реагента, очищены анионообменной хроматографией и проанализированы методом нуклеотидных карт. 5'-³²P-меченые олигонуклеотиды обрабатывали рестриктазой в различных условиях и реакционные смеси анализировали электрофорезом в полиакриламидном геле.



Оказалось, что в отличие от ряда других эндонуклеаз рестрикции, минимальные олигонуклеотидные субстраты которых длиннее, чем участок узнавания [11—13], *Vam*HI в качестве полноценного субстрата может использовать даже изолированный сайт — гексануклеотид pGGATCC (I), расщепляя в нем соответствующую фосфодиэфирную связь с образованием

* Некоторые результаты настоящей работы были доложены на конференциях в Пущино на Оке (1982 г.) и Праге (1984 г. [1]). Префикс d (дезокс) всюду опущен.

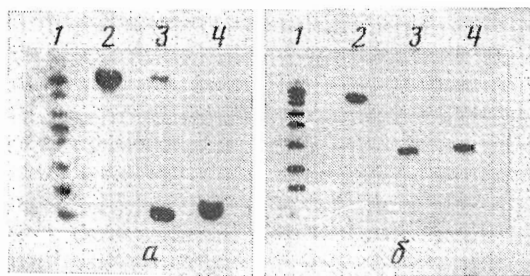


Рис. 1

Рис. 1. Расщепление октануклеотидов (II) (а) и (III) (б) рестриктазой *Bam*HI (здесь и далее анализ электрофорезом в 30% ПААГ; акриламид — бис 20 : 1; радиоавтография). 1 — частичный VPDE-гидролизат 32 P-октануклеотида, 2 — 32 P-октануклеотид, 3, 4 — инкубация 32 P-октануклеотида с ферментом (2 ед. акт./пмоль) в течение 11 ч при 4 и 22° С

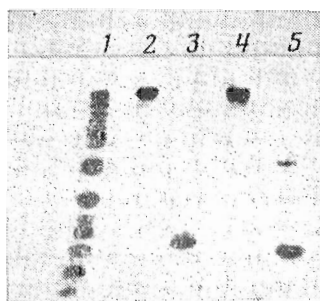


Рис. 2

Рис. 2. Расщепление тетрадекануклеотида (V) и его комплекса с SS ДНК рестриктазой *Bam*HI. 1 — частичный VPDE-гидролизат 32 P-V, 2 — 32 P-V, 3 — инкубация 32 P-V с *Bam*HI 20 ч при 4° С, 4 — комплексе 32 P-V с SS ДНК M13mp2, 5 — инкубация комплекса с *Bam*HI 20 ч при 4° С

5'-концевого мононуклеотида. Специфическую активность фермент проявляет и в тех случаях, когда субстратом служат не полностью самокомплементарные олигонуклеотиды, содержащие *Bam*HI-сайт: октануклеотиды (II) и (III) при действии *Bam*HI отщепляют соответствующие 5'-концевые моно- и тринуклеотид (рис. 1). При этом соединения (I) и (II) в течение 2 ч при 22° С расщеплялись практически полностью, а при 4 и 37° С — на 90%; октануклеотид (III) отличался от них тем, что за то же время при 4° С расщеплялся только наполовину. При переходе к декануклеотиду (IV), в котором центральная самокомплементарная шестизвенная часть с обеих сторон фланкирована некомплементарными динуклеотидами, оказалось, что он расщепляется *Bam*HI также специфически, но менее эффективно, чем соединения (I) — (III). Так, при том же соотношении фермент/вещество (2 ед. акт./1 пмоль) этот декануклеотид не изменялся при 4, 22 и 37° С в течение 11 ч. При увеличении же концентрации фермента вдвое при тех же температурах декануклеотид за 2 ч расщеплялся соответственно лишь на 16, 20 и 14% и только через 20 ч — на 69, 85 и 89%. Такое явное снижение эффективности расщепления олигонуклеотидов при увеличении их длины, но без возрастания степени самокомплементарности может рассматриваться как свидетельство того, что в действительности субстратом *Bam*HI служит не одноцепочечный олигонуклеотид, а образуемый им дуплекс (предположение о двухцепочечности субстрата *Bam*HI ранее было сформулировано в работе [5]).

Вопрос о том, способны ли эндонуклеазы рестрикции расщеплять одноцепочечные дезоксирибонуклеотиды как таковые, интересен с точки зрения механизма действия этого класса ферментов. Имеющиеся данные о фрагментации одноцепочечной ДНК под действием некоторых рестриктаз с образованием четкого набора фрагментов [14—18] сами по себе не означают, что именно одноцепочечные участки ДНК служат истинными субстратами соответствующей рестриктазы. Нуклеотидная цепь в принципе способна принимать такую вторичную структуру, в которой прямые повторы рестриктных сайтов в составе ДНК образуют двухцепочечные палиндромы, по которым и действует соответствующая рестриктаза (в связи с этим неудивительно, что данные об одноцепочечных ДНК как субстратах рестриктаз получены для тех случаев, когда молекула ДНК содержит целый ряд сайтов, способных к внутримолекулярному спариванию (см., например, недавно появившуюся публикацию [19]), но неизвестны для уникальных сайтов в составе ДНК, где подобное спаривание намного менее вероятно, так как требует межмолекулярного взаимодействия макромолекул). Аналогичное рассуждение применимо в отношении олигонуклеотидов,

содержащих рестриктные сайты: межмолекулярное взаимодействие по этим самокомплементарным участкам также должно приводить к образованию дуплексных структур (в общем случае — несовершенных), взаимодействующих с рестриктазами. При этом возникает вопрос об устойчивости таких дуплексов. Следует подчеркнуть, что при 37° С и даже при температурах, близких к комнатной, все перечисленные выше олигонуклеотиды, в том числе изолированный *Bam*HI-сайт (I), должны существовать в виде одноцепочечных структур, так как, например, восьмичленный дуплекс с четырьмя GC-парами плавится уже при 28° С [3]. Однако из этого также не следует, что разрезаются именно однонитчатые структуры. Весьма вероятно, что дуплексы, малоустойчивые в обычных условиях, могут стабилизироваться эндонуклеазой в составе реакционного комплекса и таким образом становиться весомым кинетическим фактором в реакции расщепления. Исходя из этих представлений, следует допустить возможность межмолекулярного спаривания олигонуклеотидов (и внутримолекулярного спаривания полинуклеотидов) по рестриктным сайтам, даже если эти сайты являются единственными самокомплементарными участками олигонуклеотидной цепи *.

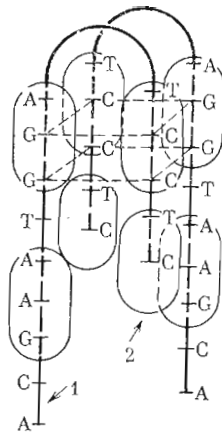
Разумеется, способность рестриктазы к структурной организации субстрата должна варьировать в зависимости от характера субстрата, в частности степени его самокомплементарности. Именно этим можно объяснить различия в эффективности расщепления эндонуклеазой *Bam*HI описанных выше олигонуклеотидов: по мере увеличения степени некомплементарности, т. е. доли некомплементарных концов, фланкирующих самокомплементарный рестриктный сайт, стабилизация соответствующего дуплекса ферментом становится все более затруднительной, что снижает эффективность разрезания при переходе от 6- и 8-членников (I) — (III) к 10-членнику (IV).

Обратившись к тетрадекануклеотиду (V), в котором *Bam*HI-сайт фланкирован несимметричными ди- и гексануклеотидом, мы полагаем, основываясь на изложенных выше соображениях, что этот 14-членник может оказаться устойчивым к действию *Bam*HI или же, подобно олигонуклеотидам (I) — (IV), будет расщепляться по *Bam*HI-сайту с образованием гептануклеотида рАСГААТГ. Однако полученные нами результаты отличались от обоих ожидаемых вариантов: 14-членник (V) действительно расщеплялся *Bam*HI, но вместо гептануклеотида образовался тринуклеотид (рис. 2). Это означает, что рестриктаза узнает в составе соединения (V) модифицированный половинный *Bam*HI-сайт ГАА и разрезает его между первыми двумя пуриновыми остатками. Механизм такого разрезания предположительно связан с особенностями высшей структуры олигонуклеотида (V), стабилизированной ферментом.

О структурно-пространственных взаимоотношениях между эндонуклеазой рестрикции *Bam*HI и разрезаемой ею нуклеотидной цепью по существу ничего неизвестно. Некоторые предположения могут быть сделаны на основании ранее опубликованных данных о взаимодействии *Bam*HI с синтетическими олигонуклеотидами [4, 5]. Так, было показано, что фермент способен расщеплять 3'-концевой тринуклеотидный сегмент GGA в составе соответствующего дуплекса (дуплекс А, см. схему); совокупность двух таких дуплексов (А + А) образует *Bam*HI-сайт, в составе которого обе цепи разрезаны посередине. В то же время дуплекс (Б), содержащий неполный *Bam*HI-сайт (отсутствует 5'-тринуклеотидный сегмент в одной из цепей), устойчив к *Bam*HI. Эти данные свидетельствуют о том, что расщепление каждого из дуплексов (А) происходит не независимо, а в комплексе (А + А), объединяющем четыре цепи. Это означает также, что субъединицы *Bam*HI, по-видимому, способны узнавать половинные *Bam*HI-сайты. Поскольку эта пара дуплексов (А + А) едва ли может ассоциировать по тупым концам самопроизвольно, образование такого ассоциата (способного рас-

* В случае не полностью самокомплементарных сайтов, например 5-звенных сайтов, в которых центральные звенья в обеих цепях неизбежно различаются (*Eco*RII и др.), олигонуклеотиды, содержащие одну из цепей такого сайта, могут быть использованы для проверки того, действует ли рестриктаза на одноцепочечную ДНК.

Рис. 3. Гипотетический комплекс *Vam*HI — 14-мер (V) с четырехнитчатой клеткообразной структурой нуклеинового компонента (ср. [21]). 1 — олигонуклеотид, 2 — субъединица фермента



щепляться *Vam*HI) позволяет предположить, что решающую роль в этой ассоциации играют субъединицы фермента, связанные с половинными *Vam*HI-сайтами. В составе двухцепочечного сайта таких субъединиц может быть две или четыре — в зависимости от того, одна или две нити по отдельности в каждой из трехзвенных половин сайта обладают сродством к субъединице (вариант сродства субъединицы к двухцепочечной половине сайта, т. е. к дуплексу (GGA)·(TCC), представляется маловероятным, так как дуплекс (B), как уже отмечалось, устойчив к *Vam*HI, а в составе дуплекса (B) тройка GGA в аналогичных условиях расщепляется) [5]. С другой стороны, разрезание частично самокомплементарных олигонуклеотидов даже при повышенной температуре (см. выше) свидетельствует о том, что фермент (субъединица) узнает одноцепочечный субстрат и играет существенную роль в формировании его дуплексной структуры. В совокупности это приводит к предположению, что каждая субъединица *Vam*HI связывается с одноцепочечной половиной участка узнавания (т. е. с соответствующим трехчленником), так что полноценный фермент-субстратный комплекс наряду с двухцепочечным гексануклеотидным сегментом содержит четыре субъединицы фермента (следует отметить, что в комплексе эндонуклеазы рестрикции *Eco*RI с ДНК электронномикроскопически обнаружено именно четыре мономера *Eco*RI на каждый участок узнавания [20]).

Структура фермент-субстратного комплекса остается неизвестной. Одна из возможностей связана с концепцией клеткообразной четырехцепочечной структуры ДНК при взаимодействии с рестриктазами [21] (см. рис. 3). Вероятно, после узнавания одной субъединицей *Vam*HI одноцепочечной половины сайта происходит образование такой четырехнитчатой структуры (при наличии рядом всех четырех субъединиц фермента) и активирование фермент-субстратного комплекса, после чего расщепляется соответствующая фосфодиэфирная связь. Поскольку в определенных условиях рестриктаза *Vam*HI способна разрезать в составе дуплекса сайт с заменой второго пуринового звена GAATCC, а также укороченный сайт GGATC [22, 23], мы предположили, что в случае тетрадекануклеотида (V) при формировании в нормальном участке узнавания такой четырехнитчатой структуры сближаются также участки неканонического узнавания (последовательность GAA, предшествующая каноническому сайту, и 3'-концевой динуклеотид TC), так что оказывается возможным возникновение активного комплекса и по этим, аномальным сайтам с участием еще четырех субъединиц *Vam*HI, что и приводит к отщеплению трехчленника (рис. 3); в таком случае расщепление по нормальному *Vam*HI-сайту, которое, по-видимому, тоже происходит, вообще не обнаруживается, так как вместе с трехчленником отщепляется метка.

Несколько иные представления о промежуточных этапах аномального расщепления 14-мера (V) связаны с возможностью образования четырехцепочечных структур в результате сближения двух несовершенных дуплексов (V)·(V) по самокомплементарному рестриктному сайту, подобно

тому как это предположительно происходит при синапсе двух двухцепочечных молекул ДНК в ходе генетической рекомбинации [24, 25]. Эти же представления можно привлечь для объяснения обсуждавшихся выше результатов работы [5], в частности, способности *Bam*HI расщеплять структуру (A).

Аномальное расщепление 14-членника (V) наблюдалось и в том случае, когда действию рестриктазы предшествовало комплексобразование олигонуклеотида с одноцепочечной (SS) ДНК фага M13mp2. Однако при этом образовывался не только трехчленник, но и гептануклеотидный продукт нормального расщепления 14-мера по *Bam*HI-сайту, причем выход этого гептануклеотида составлял около 85% от теоретически возможного количества дуплекса (SS ДНК M13mp2) — (14-мер) (рис. 2). Очевидно, что 14-мер нормально разрезается по *Bam*HI-сайту именно в составе этого дуплекса, в котором он имеет обычную вторичную структуру, тогда как избыток 14-членника расщепляется аномально, с образованием тринуклеотида.

Полученные данные иллюстрируют значение структурно-пространственной организации фермент-субстратного комплекса для специфичности разрезания ДНК рестриктазами. Некапонические высшие структуры ДНК могут играть существенную роль и в функционировании рестриктаз, в сайтах узнавания которых самокомплементарные участки разделены неспецифическими последовательностями, а также тех рестриктаз, которые расщепляют ДНК в стороне от участка узнавания.

За последние годы получено множество сведений о разнообразии и мобильности высших структур ДНК (см., например, [26—29]). Возможно, что наблюдаемое время от времени изменения характера специфичности эндонуклеаз рестрикции под влиянием различных факторов (кислотность среды, ионный состав, органические примеси и др. [22, 30—37]) связаны с влиянием этих факторов не столько на свойства самого фермента, сколько на высшую структуру ДНК.

Экспериментальная часть

В работе использовали дрожжевой экстракт и триптон фирмы Difco, реагенты для ПААГ (Reanal), DTT, $MgCl_2$ (Serva), трис(Merck), β -меркаптоэтанол (Calbiochem), $[\gamma\text{-}^{32}P]ATP$ (3000 Кп/ммоль, Amersham), фосфодиэстеразу змеиного яда (VPDE; Worthington), эндонуклеазу рестрикции *Bam*HI (КФ 3.1.23.6), предоставленную Г. В. Шпаковским, а также производство НПО «Фермент» (Вильнюс).

Одноцепочечную ДНК фага M13mp2 получали как описано в работе [38]. Полностью защищенные мононуклеотиды (DMTr) N_p xу, где N = T, bzA, bzC, ibG, x = n-хлорфенил, y = β -цианэтил, были приготовлены из 2'-дезоксинуклеозидов (Calbiochem) по описанным методикам [39]. Фосфотриэфирный синтез олигонуклеотидов проводили в растворе блочным методом [39]. Продукты синтеза деблокировали конц. водн. NH_3 (50° С, 24 ч) и 80% $AcOH$ (20° С, 30 мин) и очищали анионообменной и обращеннофазовой хроматографией [40].

Олигонуклеотиды метили по 5'-концу двукратным молярным избытком $[\gamma\text{-}^{32}P]ATP$ и T4-полинуклеотидкиназой в 50 мМ трис-HCl (pH 9,0), 10 мМ $MgCl_2$, 5 мМ DTT и выделяли гель-фильтрацией на сефадексе G-50.

Ферментативные расщепления проводили в 5 мкл буфера, содержащего 10 мМ трис-HCl (pH 7,4), 10 мМ $MgCl_2$, 6 мМ β -меркаптоэтанол, 50 мМ NaCl, 1 пмоль олигонуклеотида, 2 ед. акт. *Bam*HI, и продукты реакции разделяли электрофорезом в 20 и 30% ПААГ в 7 М мочевиине и 0,05 М трис-борате, pH 8,3. В качестве стандартов на тот же гель наносили частичный VPDE-гидролизат 5'-меченого олигонуклеотида. Пятна веществ, обнаруженные автордиографией, вырезали и просчитывали в толуольном сцинтилляторе. Степень расщепления определяли как долю радиоактивности продукта расщепления в суммарной радиоактивности.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Vinogradov S. V., Titeeva G. R., Berlin Yu. A.* Nucl. Acids Res., 1984, Symp. Ser., № 14, p. 271—272.
2. *Roberts R. J.* Nucl. Acids Res., 1985, v. 13, suppl., p. r165—r200.
3. *Goppelt M., Pingoud A., Maass G., Mayer H., Köster H., Frank R.* Eur. J. Biochem., 1980, v. 104, № 1, p. 101—107.
4. *Zinoviev V. V., Kolesnikov V. A., Beznedel'naya N. L., Gorbunov J. A., Malygin E. G.* FEBS Lett., 1981, v. 131, № 1, p. 98—100.
5. *Zinoviev V. V., Gorbunov J. A., Baclanov M. M., Popov S. G., Malygin E. G.* FEBS Lett., 1983, v. 154, № 2, p. 282—284.
6. *Alves J., Pingoud A., Haupt W., Langowski J., Peters F., Maass G., Wolff C.* Eur. J. Biochem., 1984, v. 140, № 1, p. 83—92.
7. *Yolov A. A., Gromova E. S., Romanova E. A., Oretskaya T. S., Oganov A. A., Buryanov Ya. I., Shabarova Z. A.* FEBS Lett., 1984, v. 167, № 1, p. 147—150.
8. *Ono A., Sato M., Ohtani Y., Ueda T.* Nucl. Acids Res., 1984, v. 12, № 23, p. 8939—8949.
9. *Connolly B. A., Potter B. V. L., Eckstein F., Pingoud A., Grotjahn L.* Biochemistry, 1984, v. 23, № 15, p. 3443—3453.
10. *Wolfes H., Fliess A., Pingoud A.* Eur. J. Biochem., 1985, v. 150, № 1, p. 105—110.
11. *Baumstark B. R., Roberts R. J., RajBhandary U. L.* J. Biol. Chem., 1979, v. 254, № 18, p. 8943—8950.
12. *Берлин Ю. А., Звонок Н. М., Чувицко С. А.* Биоорг. химия, 1980, т. 6, № 10, с. 1522—1535.
13. *Берлин Ю. А., Буткис В. В.* Биоорг. химия, 1981, т. 7, № 8, с. 1224—1232.
14. *Blakesley R. W., Wells R. D.* Nature, 1975, v. 257, № 5689, p. 421—422.
15. *Horiuchi K., Zinder N. D.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1975, v. 72, № 7, p. 2555—2558.
16. *Godson G. N., Roberts R. J.* Virology, 1976, v. 73, № 2, p. 561—567.
17. *Blakesley R. W., Dodgson J. B., Nes I. F., Wells R. D.* J. Biol. Chem., 1977, v. 252, № 20, p. 7300—7306.
18. *Yoo O. J., Agarwal K. L.* J. Biol. Chem., 1980, v. 255, № 22, p. 10559—10562.
19. *Nishigaki K., Kaneko Y., Wakuda H., Husimi Y., Tanaka T.* Nucl. Acids Res., 1985, v. 13, № 16, p. 5747—5760.
20. *Johannessen W., Schutte H., Mayer H., Mayer F.* Arch. Microbiol., 1984, v. 140, № 2—3, p. 265—270.
21. *Stasiak A., Klotzowski T.* J. Theor. Biol., 1979, v. 80, № 1, p. 65—82.
22. *Georg J., Blakesley R. W., Chirikjian J. G.* J. Biol. Chem., 1980, v. 255, № 14, p. 6521—6524.
23. *Baclanov M. M., Malygin E. G.* FEBS Lett., 1981, v. 132, № 1, p. 101—104.
24. *McGavin S. J.* Mol. Biol., 1971, v. 55, № 2, p. 293—298.
25. *McGavin S.* Heredity, 1977, v. 39, part 1, p. 15—25.
26. *Wang A. H.-J., Quigley G. J., Kolpak F. J., Crawford J. L., van Boom J. H., van der Marel G., Rich A.* Nature, 1979, v. 282, № 5740, p. 680—686.
27. *Lilley D. M. J.* In: Topics in nucleic acids structure/Ed. Neidle S. L.: Macmillan Press, 1982, part 2, p. 173—198.
28. *Gellert M., O'Dea M. H., Mizuuchi K.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1983, v. 80, № 18, p. 5545—5549.
29. *Wemmer D. E., Chon S. H., Pare D. R., Reid B. R.* Nucl. Acids Res., 1985, v. 13, № 10, p. 3755—3772.
30. *Ming-ta Hsu, Berg P.* Biochemistry, 1978, v. 17, № 1, p. 134—138.
31. *Clarke C. M., Hartly B. S.* Biochem. J., 1979, v. 177, № 1, p. 49—62.
32. *Woodbury C. P., Hagenbuchle O., von Hippel P. H.* J. Biol. Chem., 1980, v. 255, № 23, p. 11534—11546.
33. *Woodhead J. L., Bhave N., Malcolm A. D. B.* Eur. J. Biochem., 1981, v. 115, № 2, p. 293—296.
34. *Mayer H.* FEBS Lett., 1978, v. 90, № 2, p. 341—344.
35. *Malyguine E., Vannier P., Yot P.* Gene, 1980, v. 8, № 2, p. 163—177.
36. *Nasri M., Sayadi S., Thomas D.* FEBS Lett., 1985, v. 185, № 1, p. 101—104.
37. *Shinomiya T., Kobayashi M., Sato S., Uchida T.* J. Biochemistry, 1982, v. 92, № 6, p. 1823—1832.
38. *Messing J.* In: Protocol for the application of the singlestranded DNA phage M13mp2 as a cloning vehicle, 1979, University of California at Davis, p. 1—21.
39. *Narang S. A., Hsiung H. M., Brousseau R.* Meth. Enzymol., 1979, v. 68, p. 90—98.
40. *Вульфсон А. П., Якимов С. А.* Биоорг. химия, 1983, т. 9, № 3, с. 365—390.

Поступила в редакцию
24.XII.1985

SPECIFIC FEATURES OF THE RESTRICTION ENDONUCLEASE *Bam*HI
INTERACTION WITH OLIGODEOXYNUCLEOTIDES

TITEVA G. R., VINOGRADOV S. V., BERLIN Yu. A.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

Interaction of the restriction endonuclease *Bam*HI with a series of synthetic oligodeoxynucleotides containing the restriction site has been studied. The enzyme is shown to specifically cut the *Bam*HI site in hexanucleotide (I) and in non-selfcomplementary deca- and octanucleotides (II)–(IV). The data obtained led to the conclusion that *Bam*HI reacts with duplex structures, while playing an important role in their stabilization. In 14-mer (V) *Bam*HI cuts a non-standard half-site GAA to yield the 5'-terminal tri- (rather than hepta-) nucleotide. Hypothetical mechanisms of the process are discussed basing on conception of the role of higher DNA structures in the interaction with restriction endonucleases.