

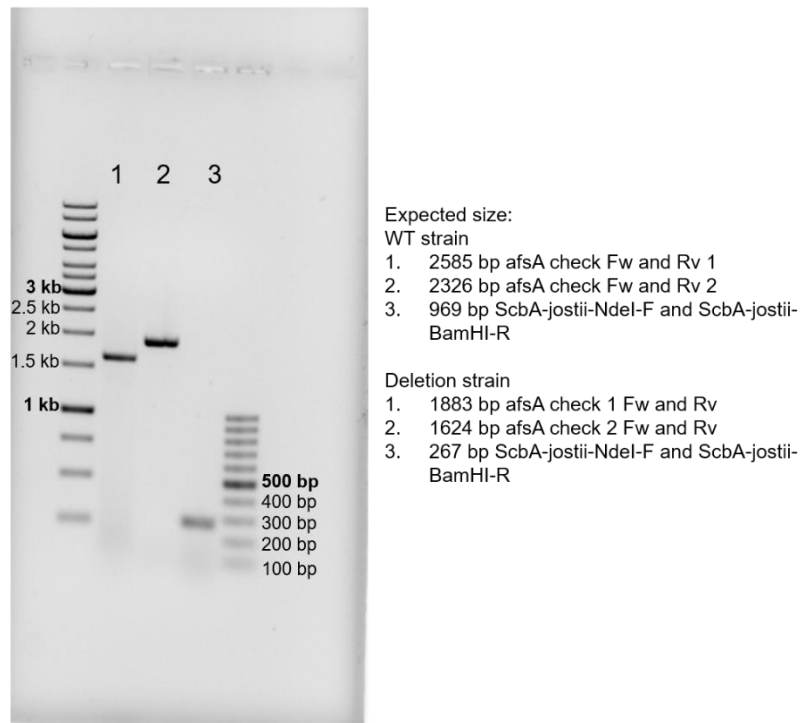
Molecular characterization of a *Rhodococcus jostii* RHA1
 γ -butyrolactone(-like) signalling molecule and its main biosynthesis gene
gblA

Ana Cenicerós, Lubbert Dijkhuizen*, and Mirjan Petrusma

Supplementary information

Supplementary Table S1 Media components used in this study.

Media components per litre							
Trypton Soya Agar	Difco Nutrient Agar	Luria Broth Agar	Starch Casein Agar	Minimum Salt Media +Casamino acids	MSM-Nitrogen deficient	SMMS	SMMS trace elements
Tryptone 15 g	Beef extract 3 g	Tryptone 10.0 g	Starch 5 g	Glucose 15 g	Glucose 15 g	Bacto casamino acids, Technical 2 g	ZnSO ₄ ·7H ₂ O 0.1 g
Soytone-enzymatic digest of soybean meal 5 g	Peptone 5 g	Yeast extract 5.0 g	Casein 1 g	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O 3.57 g	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O 3.57 g	TES buffer 5.73 g	FeSO ₄ ·7H ₂ O 0.1 g
Sodium chloride 5 g	Agar 15 g	Sodium chloride 5.0 g	Agar 20 g	MgSO ₄ ·H ₂ O 0.2 g	MgSO ₄ ·H ₂ O 0.2 g	2.46% MgSO ₄ ·7H ₂ O 5 ml	MnCl ₂ ·4H ₂ O 0.1 g
Agar 15 g		Agar 10.0 g	pH 7	CaCO ₃ 0.02 g	CaCO ₃ 0.02 g	Trace elements 2 ml	CaCl ₂ ·2H ₂ O 0.07 g
				FeSO ₄ ·7H ₂ O 0.01 g	FeSO ₄ ·7H ₂ O 0.01 g	55% Glucose·H ₂ O 20 ml	NaCl 0.1 g
				H ₃ BO ₃ 50 µg	H ₃ BO ₃ 50 µg	0.69% NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O + 0.87% K ₂ HPO ₄ 5 ml	
				CuSO ₄ ·H ₂ O 10 µg	CuSO ₄ ·H ₂ O 10 µg	Adjust pH to 7.2	
				MnSO ₄ ·4H ₂ O 40 µg	MnSO ₄ ·4H ₂ O 40 µg	Lab-M Agar 20 g	
				ZnSO ₄ ·7H ₂ O 40 µg	ZnSO ₄ ·7H ₂ O 40 µg		
				Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O 24 µg	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O 24 µg		
				Bacto casamino acids Technical 2 g	Agar 20 g		
				Agar 20 g	pH 7.2		
				pH 7.2			



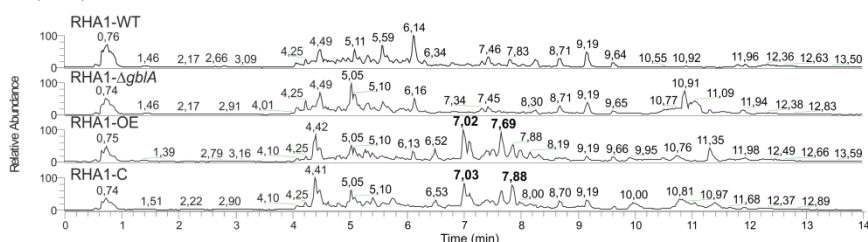
Supplementary Figure S1 PCR check of the *afsA* deletion strain. Expected size of the products for the wild type and the deletion strain is marked on the right. The obtained bands correspond to the deletion of *afsA*

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Supplementary Figure S2 Alignment of the predicted GblA enzyme from *R. jostii* RHA1 with the previously described GblA enzymes from *S. venezuelae*, *S. griseus* and *S. coelicolor*. AfsA repeats predicted by Uniprot and CCD are marked with a black line on the top. Active sites in *S. coelicolor* GblA are marked with a star^{1, 2}

a)

RT: 0.00 - 14.03



NL: 1.75×10^7
m/z = 187.0000-350.2000 F: FTMS {1;2} - p ESI Full ms

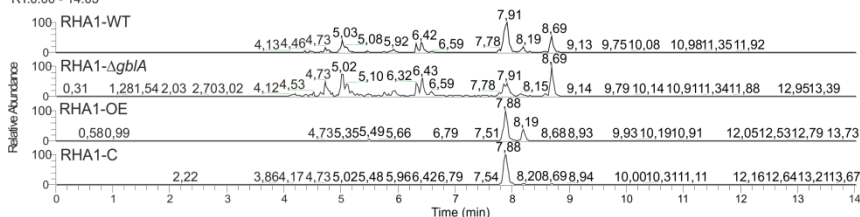
NL: 2.81×10^7
m/z = 187.0000-350.2000 F: FTMS {1;2} - p ESI Full ms

NL: 2.23×10^7
m/z = 187.0000-350.2000 F: FTMS {1;2} - p ESI Full ms

NL: 3.72×10^7
m/z = 187.0000-350.2000 F: FTMS {1;2} - p ESI Full ms

b)

RT: 0.00 - 14.03



NL: 2.35×10^5
m/z = 255.1000-255.2000 F: FTMS {1;2} - p ESI Full ms

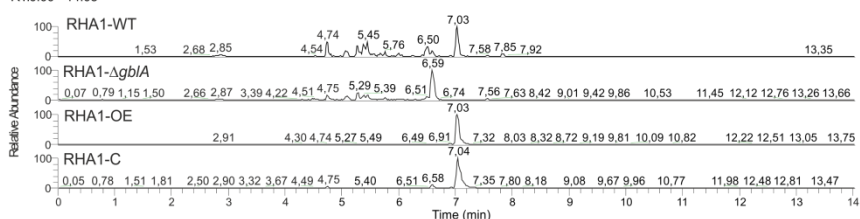
NL: 1.71×10^5
m/z = 255.1000-255.2000 F: FTMS {1;2} - p ESI Full ms

NL: 8.53×10^5
m/z = 255.1000-255.2000 F: FTMS {1;2} - p ESI Full ms

NL: 1.94×10^7
m/z = 255.1000-255.2000 F: FTMS {1;2} - p ESI Full ms

c)

RT: 0.00 - 14.03



NL: 1.27×10^5
m/z = 289.1000-289.2000 F: FTMS {1;2} - p ESI Full ms

NL: 3.19×10^5
m/z = 289.1000-289.2000 F: FTMS {1;2} - p ESI Full ms

NL: 4.06×10^6
m/z = 289.1000-289.2000 F: FTMS {1;2} - p ESI Full ms

NL: 4.85×10^6
m/z = 289.1000-289.2000 F: FTMS {1;2} - p ESI Full ms

Supplementary Figure S3. LC-MS analysis of ethyl acetate extracts from different *R. jostii* RHA1 strains. a) LC-MS Chromatogram in the mass range of m/z 187-350 [M-H]⁺. In bold, peaks found in extracts of the RHA1-OE and RHA1-C strains that were in a much lower intensity in the wild type and not observed in strain RHA1- $\Delta gblA$. b) LC-MS chromatogram in the mass range m/z 255.1 and 255.2 [M-H]⁺ to search for the mass found in the 7.88 min peak (m/z 255.1236 amu [M-H]⁺). This peak was present in a higher intensity in the extracts of strains RHA1-OE and RHA1-C (9.53×10^6 and 1.94×10^7 respectively) than in the wild type (2.35×10^5). A peak at 7.91 min was observed in the RHA1- $\Delta gblA$ strain but this peak corresponded to a different mass that was also found in the other strains tested. c) LC-MS chromatogram in the mass range m/z 289.1 and 289.2 [M-H]⁺ searching for the mass m/z 289.1658 amu [M-H]⁺, one of the major masses found in the 7.03 min peak. A peak was observed in all strains except RHA1- $\Delta gblA$. As in the previous case, the intensity of this peak was higher in strains RHA1-OE and RHA1-C (4.06×10^6 and 4.85×10^6 respectively) than in the RHA1-WT strain (1.27×10^5). None of these masses correspond to described γ -butyrolactones.

References

1. Martin-Sanchez, L. *et al.* Identification and characterisation of enzymes involved in γ -butyrolactone biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*. In: Quorum sensing in *Streptomyces coelicolor*: Regulation of the SCB signalling system that controls the synthesis of antibiotics. *PhD thesis L. Martin-Sanchez, University of Groningen* http://www.rug.nl/research/portal/files/26679124/Chapter_3.pdf, 91-138 (2016).
2. Hsiao, N. H. *et al.* ScbA from *Streptomyces coelicolor* A3(2) has homology to fatty acid synthases and is able to synthesize gamma-butyrolactones. *Microbiology* **153**, 1394-1404 (2007).