

Supplementary Materials

# New Imidazolium Alkaloids with Broad Spectrum of Action from the Marine Bacterium *Shewanella aquimarina*

Rosa Giugliano <sup>1,†</sup>, Gerardo Della Sala <sup>2,†</sup>, Carmine Buonocore <sup>2,†</sup>, Carla Zannella <sup>1</sup>, Pietro Tedesco <sup>2</sup>, Fortunato Palma Esposito <sup>2</sup>, Costanza Ragozzino <sup>2,3</sup>, Annalisa Chianese <sup>1</sup>, Maria Vittoria Morone <sup>1</sup>, Valerio Mazzella <sup>4,5</sup>, Laura Núñez-Pons <sup>5,6</sup>, Veronica Folliero <sup>7</sup>, Gianluigi Franci <sup>7</sup>, Anna De Filippis <sup>1</sup>, Massimiliano Galdiero <sup>1,\*</sup> and Donatella de Pascale <sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Experimental Medicine, University of Campania “Luigi Vanvitelli”, 80138 Naples, Italy; rosa.giugliano@unicampania.it (R.G.); carla.zannella@unicampania.it (C.Z.); annalisa.chianese@unicampania.it (A.C.); mariavittoria.morone@unicampania.it (M.V.M.); anna.defilippis@unicampania.it (A.D.F.)

<sup>2</sup> Department of Ecosustainable Marine Biotechnology, Stazione Zoologica Anton Dohrn, Via Ammiraglio Acton, 55, 80133 Naples, Italy; gerardo.dellasala@szn.it (G.D.S.); carmine.buonocore@szn.it (C.B.); pietro.tedesco@szn.it (P.T.); fortunato.palmaesposito@szn.it (F.P.E.); costanza.ragozzino@studenti.unime.it (C.R.)

<sup>3</sup> Department of Chemical, Biological, Pharmaceutical and Environmental Sciences, University of Messina, Viale F. Stagno d’Alcontres 31, 98166 Messina, Italy

<sup>4</sup> Department of Integrative Marine Ecology (EMI), Stazione Zoologica Anton Dohrn, Ischia Marine Centre, Ischia, 80077 Naples, Italy; valerio.mazzella@szn.it

<sup>5</sup> NBFC, National Biodiversity Future Center, 90133 Palermo, Italy; laura.nunezpons@szn.it

<sup>6</sup> Department of Integrative Marine Ecology (EMI), Stazione Zoologica Anton Dohrn, Villa Comunale, 80121 Napoli, Italy

<sup>7</sup> Department of Medicine, Surgery and Dentistry “Scuola Medica Salernitana”, University of Salerno, 84081 Baronissi, Italy; vfolliero@unisa.it (V.F.); gfranci@unisa.it (G.F.)

\* Correspondence: massimiliano.galdiero@unicampania.it (M.G.); donatella.depascale@szn.it (D.d.P.)

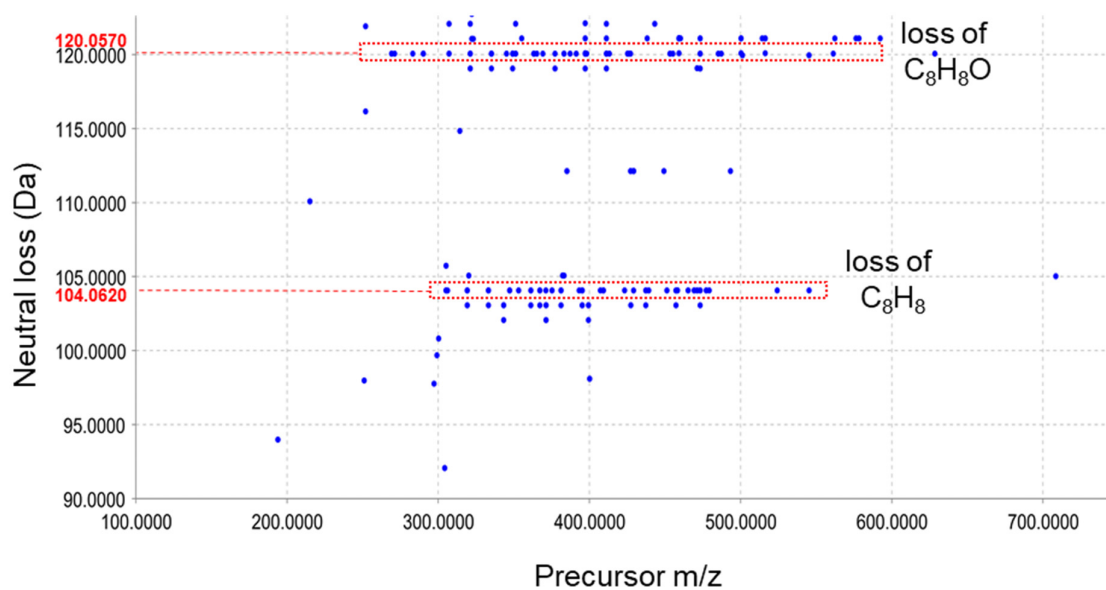
† These authors contributed equally to this work.

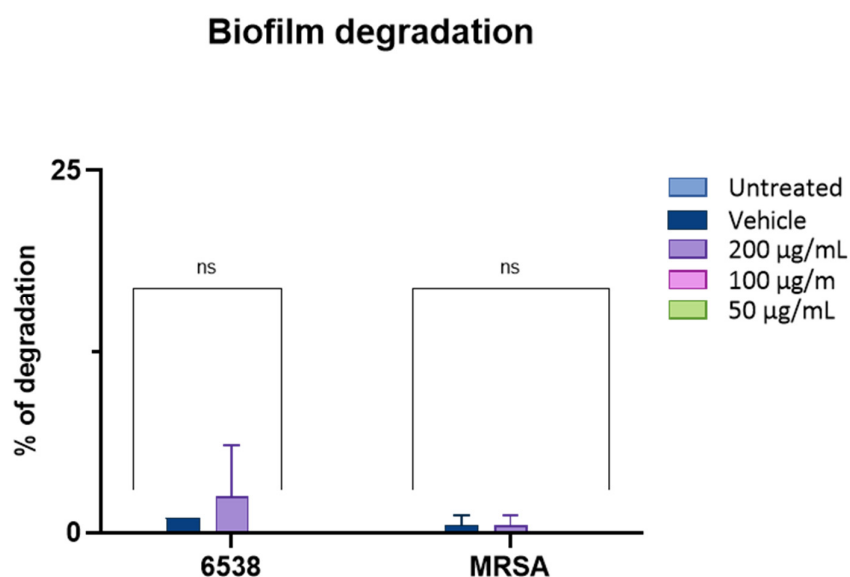
<b>Contents</b>	<b>2</b>
Table S1: Diketopiperazines from <i>Shewanella aquimarina</i>	3
Figure S1. Neutral loss/precursor <i>m/z</i> plot from HR-MS/MS data of the F2 fraction	3
Figure S2. Biofilm degradation	4
Figure S3. Antiviral activity vs HSV-1	4
Figure S4. Antiviral activity vs HCoV-229E	5
Figure S5: Antiviral activity vs PV-1	5
Figure S6: MRSA antibiogram	6
Figure S7: MSSA antibiogram	7
Figure S8: β—Lactamase antibiogram	8
Figure S9: QRSA antibiogram	9
Figure S10: MLSB antibiogram	10

**Table S1.** Diketopiperazines from *Shewanella aquimarina*.

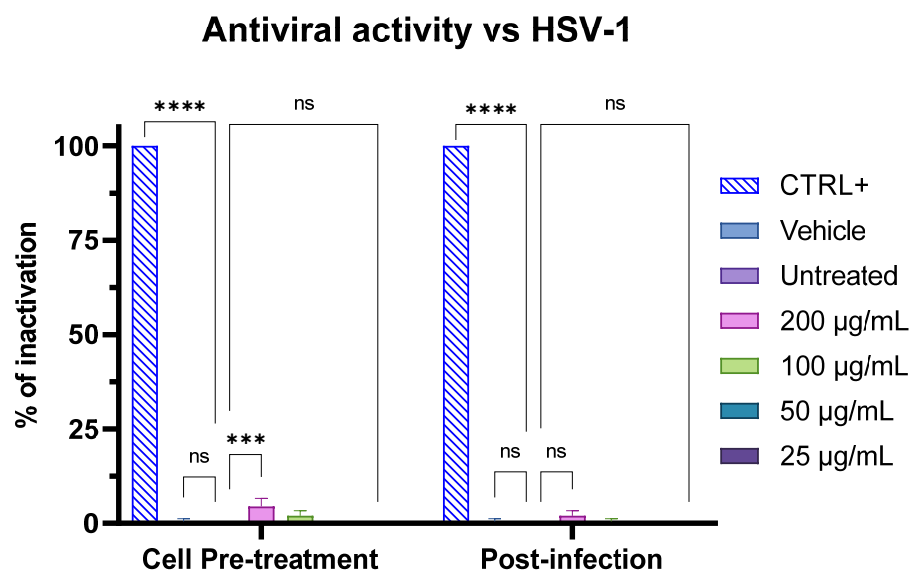
Diketopiperazines from F2			
Diketopiperazine	$R_t$	$[M+H]^+$	$m/z$
cyclo(Leu-Val)	11.9	$C_{11}H_{19}N_2O_2$	213.1603
cyclo(Met-Pro), S-Oxide	1.4	$C_{10}H_{16}N_2SO_3$	245.0959
cyclo(Phe-Pro)	11.4	$C_{14}H_{17}N_2O_2$	245.1290
cyclo(Tyr-Pro)	4.9	$C_{14}H_{17}N_2O_3$	261.1239
cyclo(Ile-Pro)	9.4	$C_{11}H_{19}N_2O_2$	211.1447
cyclo(His-Pro)	0.8	$C_{11}H_{15}N_4O_2$	235.1192

### Neutral loss/precursor $m/z$ plot

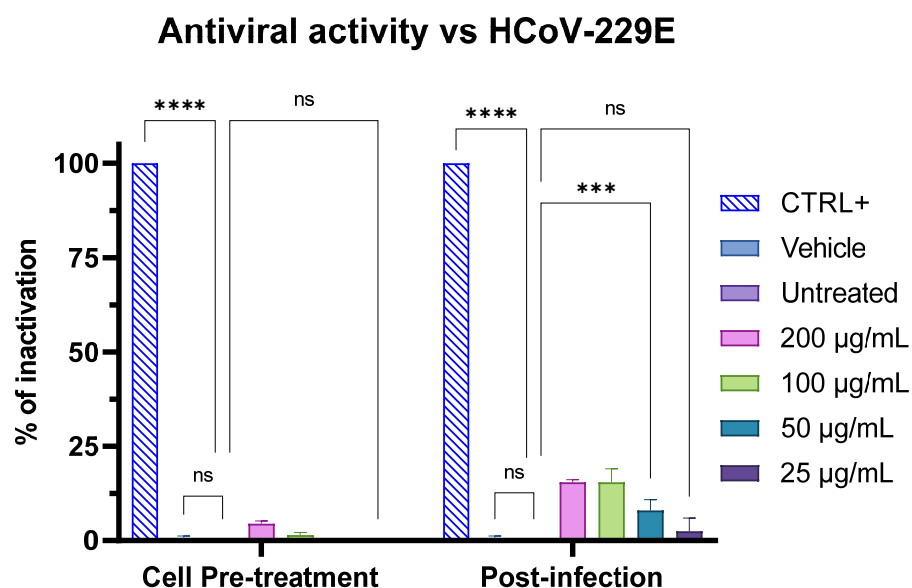
**Figure S1.** Neutral loss/precursor  $m/z$  plot from HR-MS/MS data of the F2 fraction from *Shewanella aquimarina*. Precursor ions sharing neutral losses of  $C_8H_8$  (104.0620 Da) and/or  $C_8H_8O$  (120.0570 Da), are highlighted in red.



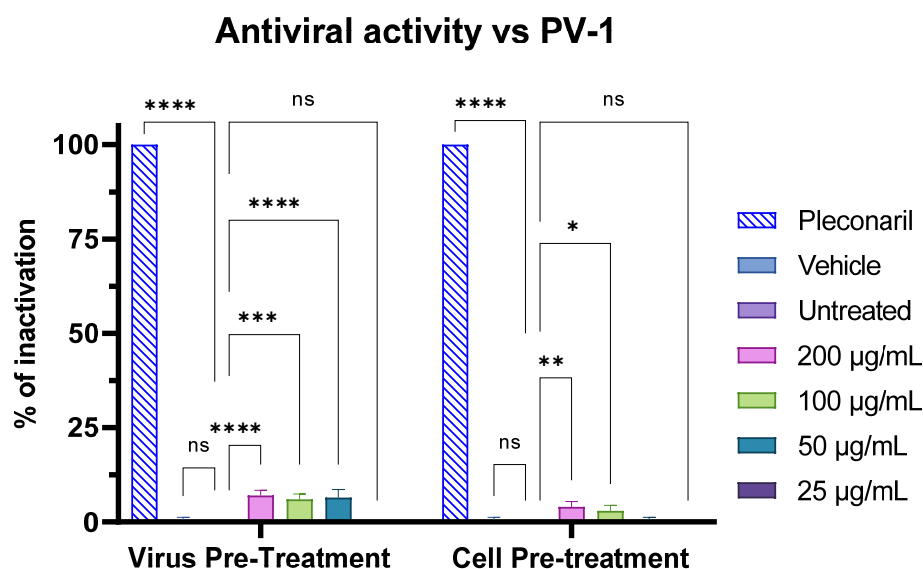
**Figure S2.** Biofilm degradation activity of F2 against *S. aureus* 6538 and MRSA. Statistical analyses were determined by two-way ANOVA with Dunnett's test for multiple comparisons referred to the untreated bacteria. ns (not statistically significant).



**Figure S3.** Antiviral activity of F2 against HSV-1 in the cell pre-treatment and post-infection assays. Dextran sulfate (1 µM) and aciclovir (5 µM) were used for cell pretreatment and post-treatment, respectively. Statistical analyses were determined by two-way ANOVA with Dunnett's test for multiple comparisons referred to the untreated infected cells \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , \*\*\*  $p < 0.0002$ , ns (not statistically significant).



**Figure S4.** Antiviral activity of F2 against HCoV-229E in the cell pre-treatment and post-infection assays. Dextran sulfate (1  $\mu$ M) and aciclovir (5  $\mu$ M) were used for cell pretreatment and post-treatment, respectively. Statistical analyses were determined by two-way ANOVA with Dunnett's test for multiple comparisons referred to the untreated infected cells \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , \*\*\*  $p < 0.0002$ , ns (not statistically significant).



**Figure S5.** Antiviral activity of F2 against PV-1 in the virus and cell pre-treatment assays. Pleconaril 10  $\mu$ M was used as positive control. Statistical analyses were determined by two-way ANOVA with Dunnett's test for multiple comparisons referred to the untreated infected cells \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , \*\*\*  $p < 0.0002$ , \*\*  $p < 0.0021$ , \*  $p < 0.0332$ , ns (not statistically significant).

ST. AUKEUS KRA  
31/12/15

SERVIZIO DI MICROBIOLOGIA

Cliente bioMerieux: S U N      Lab report      Stampato 27-nov-2015 11:44 CET  
N. sistema: 1498      Stampato da: LabAdmin

Nome paziente: [REDACTED]      \*\*\* Allerta applicato \*\*\*      ID paziente: 52187

Gruppo di isolati: 52187.11-1

Tipo di card: AST-P632 Test dello strumento: 00000B4D4CDB (1498)

---

Quantità organismo:

Commenti:	ATTENZIONE CEPPO MRSA
	ATTENZIONE CEPPO MRSA

---

Informazioni sull'identificazione			
Microrganismo selezionato	Staphylococcus aureus		
Imnesso:	25-nov-2015 10:33 CET	Da:	labadmin

**Messaggi di analisi:**

Un test ICR positivo indica resistenza inducibile ai macrolidi, lincosamidi e streptogramina tipo B. Tale isolato si presume resistente alla clindamicina che tuttavia potrebbe essere efficace in alcuni casi.

Resistenza a basso livello - una MIC di 2, 4, 32, 64 per la mupirocina rappresenta l'intero range intermedio (2-256).

---

Informazioni sull'antibiogramma	Card:	AST-P632	Numero di lotto:	732366110	Scade:	22-dic-2016 12:00 CET
	Completato:	25-nov-2015 20:07 CET	Stato:	Finale	Tempo di analisi:	10,00 ore

Antimicrobico	MIC	Interpretazione	Antimicrobico	MIC	Interpretazione
Cefoxitina screening	POS	+	Teicoplanina	<= 0,5	S
Benzilpenicillina	> 0,25	R	Vancomicina	<= 0,5	S
Oxacillina	> 2	R	Tetraciclina	<= 1	S
Gentamicina	> 8	R	Tigeciclina	<= 0,12	S
Levofloxacina	> 4	R	Fosfomicina	> 64	R
Resistenza inducibile alla Clindamicina	POS	+	Acido fusidico	<= 0,5	S
Eritromicina	> 4	R	Mupirocina	<= 2	S
Clindamicina	0,25	*R	Rifampicina	> 2	R
Linezolid	2	S	Trimetoprim/Sulfametossazolo	20	S
Daptomicina	0,25	S			

+= Antibiotici dedotti    \*= Modificato AES    \*\*= Modificato utente

---

Versione di VITEK 2 Systems installata: 07.01  
Linea guida interpretazione MIC: EUCAST 2015\_MICETI  
Nome del set di parametri AES: EUCAST\_2015\_MICETI

Linea guida interpretazione terapeutica: Copia di EUCAST-based\_2015  
Ultima modifica parametri AES: 2-nov-2015 14:13 CET

Pagina 1 di 2

Figure S6. MRSA strain antibiogram.



st. aureus  $\beta$   
31/12/15

Cliente bioMerieux:  
N. sistema:

## Lab report

Stampato 18-nov-2014 11:06 CST  
Stampato da: labadmin

Nome paziente: 31/3/89  
Gruppo di isolati: 52279-1

ID paziente: 52279.10

Organismo selezionato: Staphylococcus aureus

Commenti:	

Informazioni sull'identificazione	
Microrganismo selezionato	Staphylococcus aureus
Imnesso: 23-ott-2014 11:19 CDT Da: labadmin	
Messaggi di analisi:	

Informazioni sull'antibiogramma			Card:	Numero di lotto:	Scade:
			AST-P632	732323640	24-ott-2015 13:00 CDT
			Completato:	23-ott-2014 17:48 CDT	Stato: Finale
					Tempo di analisi: 8,25 ore
Antimicrobico	MIC	Interpretazione	Antimicrobico	MIC	Interpretazione
Cefoxitina screening	NEG	-	Teicoplanina	<= 0,5	S
Benzilpenicillina	>= 0,5	R	Vancomicina	1	S
Oxacillina	0,5	S	Tetraciclina	<= 1	S
Gentamicina	4	R	Tigeciclina	<= 0,12	S
Levofloxacina	0,25	S	Fosfomicina		
Resistenza inducibile alla Clindamicina	NEG	-	Acido fusidico	<= 0,5	S
Eritromicina	>= 8	R	Mupirocina	<= 2	
Clindamicina	0,25	S	Rifampicina	<= 0,03	S
Linezolid	2	S	Trimetoprim/Sulfametossazolo	<= 10	S
Daptomicina	1	S			

\*= Antibiotici dedotti \*\*= Modificato AES \*\*\*= Modificato utente

Conclusioni AES:		Ultima modifica: 8-apr-2014 09:18 CDT	Set di parametri: EUCAST2014+MICE Tlvers. 5.04
Livello di affidabilità:	Coerente		

Azione  
Revisionato da: Nome (ID utente) (labadmin) Data/Ora 3-nov-2014 12:13 CST Commento

Versione di VITEK 2 Systems installata: 05.04  
Linea guida interpretazione MIC: EUCAST\_MOD\_2014 Linea guida interpretazione terapeutica: EUCAST-based\_MOD\_2014  
Nome del set di parametri AES: EUCAST2014+MICETlvers. 5.04 Ultima modifica parametri AES: 8-apr-2014 09:18 CDT

Pagina 1 di 1

Figure S8.  $\beta$ -lactamase producer strain antibiogram.

REFERTO - FINALE	
Pagina 1/1 26/07/2017 10:08:46	
Nome paziente:	██████████
ID paziente:	51883.07
Data di nascita:	
Sesso paziente:	Non specificato
N accesso:	51883.07
Tipo campione:	CATETERE VENOSO CENTRALE
Reparto ospedaliero:	7301 TER INTENSIVA NEONATALE
Data ricezione:	21/07/2017 09:49:51

**Nome organismo**

1 STAAUE Staphylococcus aureus

**Commenti****Marker di resistenza**

1 STAIML Fenotipo MLSb inducibile di Staphylococcus

Antibiotico	STAAUE	
	MIC/Conc.	SIR
Acido fusidico	<=0,5	S
Ampicillina		R
Ceftaroline	0,5	S
Ciprofloxacina	>4	R
Clindamicina		R
Daptomicina	<=0,5	S
Eritromicina	>2	R
Fosfomicina c/G6P	<=16	S
Gentamicina	2	R
Linezolid	2	S
Moxifloxacina	>1	R
Mupirocina alto livello	<=256	S
Oxacillina	0,5	S
Penicillina G	>0,25	R
Teicoplanina	<=0,5	S
Tetraciclina	<=0,5	S
Tigeciclina	<=0,25	S
Trimetoprim-sulfametoxazolo	<=1/19	S
Vancomicina	1	S

Figure S9. QRSA strain antibiogram.

3/12/15

Stampato 20-01-2014 08.43 CDT

rapporto grafico microbiologia

Clinica ortopedica

Nome paziente: [REDACTED] ID paziente: [REDACTED]  
 Posizione: [REDACTED] Medico: [REDACTED]  
 ID lab.: 51119 Numero di isolato: 1

Organismo selezionato: Staphylococcus aureus

Prelevato: [REDACTED]

Origine: [REDACTED]

Commenti: [REDACTED]

Informazioni sull'antibiogramma			Tempo di analisi: 9,50 ore		Stato Finale	
Antimicrobico	MIC	Interpretazione	Antimicrobico	MIC	Interpretazione	
Cefoxitina screening	NEG	-	Daptomicina	1	S	
Benzilpenicillina	>= 0,5	R	Teicoplanina	<= 0,5	S	
Oxacillina	<= 0,25	S	Vancomicina	<= 0,5	S	
Gentamicina	<= 0,5	S	Tetraciclina	<= 1	S	
Levofloxacina	0,25	S	Tigeciclina	<= 0,12	S	
Resistenza inducibile alla Clindamicina	NEG	-	Acido fusidico	<= 0,5	S	
Eritromicina	>= 8	R	Rifampicina	<= 0,03	S	
Clindamicina	>= 4	R	Trimetoprim/Sulfametossazolo	<= 10	S	
Linezolid	2	S				

+= Antibiotici dedotti \* = Modificato AES \*\* = Modificato utente

Conclusioni di AES	
Affidabilità:	Coerente
Fenotipo:	MACROLIDI/LINCOSAMIDI/STREPTOGRAMINE   MLSB+SA COSTITUTIVO

Figure S10. MLSB strain antibiogram