**Suppementary File 1: List of pre-protein sequences used.**

|  |  |
| --- | --- |
| **Protein name** | **Sequence\*** |
| pSpyXLX  (wt)† | MRKLTALFVASTLALGAANLAHA*ADTTTAAPADAKPMMHHKGKFGPHQDMMFKDLNLTDAQKQQIREIMKGQRDQMKRPPLEERRAMHDIIASDTFDKVKAEAQIAKMEEQRKANMLAHMETQNKIYNILTPEQKKQFNANFEKRLTERPAAKGKMPATAE*ADTTTAAPADAKPMMHHKGKFGPHQDMMFKDLNLTDAQKQQIREIMKGQRDQMKRPPLEERRAMHDIIASDTFDKVKAEAQIAKMEEQRKANMLAHMETQNKIYNILTPEQKKQFNANFEKRLTERPAAKGKMPATAEGSG*VSGWRLFKKIS*GSG*ADTTTAAPADAKPMMHHKGKFGPHQDMMFKDLNLTDAQKQQIREIMKGQRDQMKRPPLEERRAMHDIIASDTFDKVKAEAQIAKMEEQRKANMLAHMETQNKIYNILTPEQKKQFNANFEKRLTERPAAKGKMPATAE*GSG*ENLYFQG*HHHHHH |
| pSpyR→Q | ADTTTAAPADAKPMMHHKGKFGPHQDMMFKDLNLTDAQKQQI**Q**EIMKGQ**Q**DQMK**Q**PPLEE**QQ**AMHDIIASDTFDKVKAEAQIAKMEEQ**Q**KANMLAHMETQNKIYNILTPEQKKQFNANFEK**Q**LTE**Q**PAAKGKMPATAE |
| pSpyK→Q | ADTTTAAPADAKPMMHH**Q**GKFGPHQDMMF**Q**DLNLTDAQKQQIREIM**Q**GQRDQMKRPPLEERRAMHDIIASDTFD**Q**VKAEAQIA**Q**MEEQRKANMLAHMETQN**Q**IYNILTPEQK**Q**QFNANFEKRLTERPAA**Q**GKMPATAE |
| pSpyR→K | ADTTTAAPADAKPMMHHKGKFGPHQDMMFKDLNLTDAQKQQI**K**EIMKGQKDQMK**K**PPLEEKKAMHDIIASDTFDKVKAEAQIAKMEEQ**K**KANMLAHMETQNKIYNILTPEQK**K**QFNANFEK**K**LTE**K**PAAKGKMPATAE |
| pSpyK→R | ADTTTAAPADAKPMMHHKGKFGPHQDMMF**R**DLNLTDAQKQQIREIM**R**GQRDQMKRPPLEERRAMHDIIASDTFD**R**V**R**AEAQIA**R**MEEQRKANMLAHMETQN**R**IYNILTPEQKRQFNANFE**R**RLTERPAAKGKMPATAE |
| pSpyQ→K | ADTTTAAPADAKPMMHHKGKFGPH**K**DMMFKDLNLTDA**K**KQ**K**IREIMKGQRD**K**MKRPPLEERRAMHDIIASDTFDKVKAEA**K**IAKMEE**K**RKANMLAHMET**K**NKIYNILTPEQKK**K**FNANFEKRLTERPAAKGKMPATAE |
| pSpyQ→R | ADTTTAAPADAKPMMHHKGKFGPH**R**DMMFKDLNLTDA**R**KQ**R**IREIMKGQRD**R**MKRPPLEERRAMHDIIASDTFDKVKAEA**R**IAKMEE**R**RKANMLAHMET**R**NKIYNILTPEQKK**R**FNANFEKRLTERPAAKGKMPATAE |
| pSpyE→Q | ADTTTAAPADAKPMMHHKGKFGPHQDMMFKDLNLTDAQKQQIR**Q**IMKGQRDQMKRPPLE**Q**RRAMHDIIASDTFDKVKA**Q**AQIAKME**Q**QRKANMLAHM**Q**TQNKIYNILTP**Q**QKKQFNANF**Q**KRLT**Q**RPAAKGKMPATAE |
| pSpyQ→E | ADTTTAAPADAKPMMHHKGKFGPH**E**DMMFKDLNLTDA**E**KQ**E**IREIMKGQRD**E**MKRPPLEERRAMHDIIASDTFDKVKAEA**E**IAKMEE**E**RKANMLAHMET**E**NKIYNILTPEQKK**E**FNANFEKRLTERPAAKGKMPATAE |
| pSpyL→A | ADTTTAAPADAKPMMHHKGKFGPHQDMMFKD**A**N**A**TDAQKQQIREIMKGQRDQMKRPP**A**EERRAMHDIIASDTFDKVKAEAQIAKMEEQRKANM**A**AHMETQNKIYNI**A**TPEQKKQFNANFEKR**A**TERPAAKGKMPATAE |
| pSpyA→L | ADTTTAAPADAKPMMHHKGKFGPHQDMMFKDLNLTD**L**QKQQIREIMKGQRDQMKRPPLEERRAMHDII**L**SDTFDKVKAE**L**QIAKMEEQRK**L**NMLAHMETQNKIYNILTPEQKKQFN**L**NFEKRLTERPA**L**KGKMPAT**L**E |
| pSpyI→T | ADTTTAAPADAKPMMHHKGKFGPHQDMMFKDLNLTDAQKQQ**T**RE**T**MKGQRDQMKRPPLEERRAMHD**TT**ASDTFDKVKAEAQ**T**AKMEEQRKANMLAHMETQNK**T**YN**T**LTPEQKKQFNANFEKRLTERPAAKGKMPATAE |
| pSpyT→V | ADTTTAAPADAKPMMHHKGKFGPHQDMMFKDLNL**V**DAQKQQIREIMKGQRDQMKRPPLEERRAMHDIIASD**V**FDKVKAEAQIAKMEEQRKANMLAHME**V**QNKIYNIL**V**PEQKKQFNANFEKRL**V**ERPAAKGKMPA**V**AE |
| pSpy∆h1 | ADTTTAAPADAKPMMHHKGKFGPHQDMMFKDLNLTDAQKQQIREIMKGQRDQMKRPP**IDD**RR**GV**HDIIASDTFDKVKAEAQIAKMEEQRKANMLAHMETQNKIYNILTPEQKKQFNANFEKRLTERPAAKGKMPATAE |
| pSpy∆h2 | ADTTTAAPADAKPMMHHKGKFGPHQDMMFKDLNLTDAQKQQIREIMKGQRDQMKRPP**IDD**RR**GV**HDIIASDTFDKVK**GDV**QIAKMEEQRKANMLAHMETQNKIYNILTPEQKKQFNANFEKRLTERPAAKGKMPATAE |
| pSpy∆h3 | ADTTTAAPADAKPMMHHKGKFGPHQDMMFKDLNLTDAQKQQIREIMKGQRDQMKRPP**IDD**RR**GV**HDIIASDTFDKVK**GDV**QIAKMEEQRKAN**VIG**H**VD**TQNKIYNILTPEQKKQFNANFEKRLTERPAAKGKMPATAE |
| pSpy∆φ1 | ADTTTAAPADAKPMMHHKGKFGPHQDMMFKDLNLTDAQKQQIREIMKGQRDQMKRPPLEERRAMHD**QQ**ASDTFDKVKAEAQIAKMEEQRKANMLAHMETQNKIYNILTPEQKKQFNANFEKRLTERPAAKGKMPATAE |
| pSpy∆φ2 | ADTTTAAPADAKPMMHHKGKFGPHQDMMFKDLNLTDAQKQQIREIMKGQRDQMKRPPLEERRAMHD**QQ**ASDTFDK**N**KAEAQ**Q**AKMEEQRKANMLAHMETQNKIYNILTPEQKKQFNANFEKRLTERPAAKGKMPATAE |
| pSpy∆φ3 | ADTTTAAPADAKPMMHHKGKFGPHQDMMFKDLNLTDAQKQQIREIMKGQRDQMKRPPLEERRAMHD**QQ**ASDTFDK**N**KAEAQ**Q**AKMEEQRKANMLAHMETQNK**Q**YN**Q**LTPEQKKQFNANFEKRLTERPAAKGKMPATAE |
| pSpyF→W | ADTTTAAPADAKPMMHHKGK**W**GPHQDMM**W**KDLNLTDAQKQQIREIMKGQRDQMKRPPLEERRAMHDIIASDT**W**DKVKAEAQIAKMEEQRKANMLAHMETQNKIYNILTPEQKKQ**W**NAN**W**EKRLTERPAAKGKMPATAE |

\*for XLX variants, only the middle (altered) sequence is shown.

†colour scheme: SS, *constant mSpy*, variable mSpy, linker, *Pep86*, *TEV site* and his tag.