Supplementary Information

<u>Title</u>

Strain-dependent neutralization reveals antigenic variation of human parechovirus 3

Authors

Eveliina Karelehto^{1*}, Sabine van der Sanden¹, James A Geraets², Aušra Domanska², Lonneke van der Linden¹, Dionne Hoogendoorn¹, Gerrit Koen¹, Hetty van Eijk¹, Shabih Shakeel², Tim Beaumont³, Menno de Jong¹, Dasja Pajkrt⁴, Sarah J Butcher² and Katja C Wolthers¹

¹Department of Medical Microbiology, Laboratory of Clinical Virology, Academic Medical Center, University of Amsterdam, The Netherlands ²Institute of Biotechnology & Department of Biosciences, University of Helsinki, Finland ³AIMM Therapeutics, Academic Medical Center, Amsterdam, the Netherlands ⁴Department of Pediatric Infectious Diseases, Emma Children's Hospital, Academic Medical Center (AMC), Amsterdam, the Netherlands

*Corresponding author



Supplementary Figure 1. Labeled roadmaps of HPeV3 strains in comparison to the prototype A308/99, showing capsid proteins VP0 (blue), VP3 (green) and VP1 (pink). The AT12-015 Fab footprint (yellow contour) is mapped on annotated surface residues differing between the strains (red). a) Enlarged view showing all surface variation for this subset of HPeV3 isolates, with amino acid residues colored red. b) Close-up labeled view of surface variation. c-o) Comparison of individual strains to A308/99 prototype: c) AUS 178608 2013. d) AUS 162090 2015. e) AUS 166178 2015. f) JP A308/99 prototype WT. g) JP A308/99 resistant variant. h) JP 1352 2008. i) JP 1588 2011. j) JP 1320 2014. k) NL RIVM 1990. l) NL K8-94 1994. m) NL 152037 2001. n) NL 2051181 2005. o) NL 21051825 2010.



Supplementary Figure 2. Modeling of surface differences between HPeV3 strains. a) Position of modeled asymmetric unit of HPeV3 A308/99 in the capsid, showing capsid proteins VP0 (blue), VP3 (green) and VP1 (pink) (other protein units are partially transparent). b) Close-up view of asymmetric unit with all variation in amino acid residues colored red (not minimized). c-o) Differences in amino acid residues between HPeV3 strains compared to prototype A308/99 (red), modeled as described in Materials and Methods: c) AUS 178608 2013. d) AUS 162090 2015. e) AUS 166178 2015. f) JP A308/99 prototype WT. g) JP A308/99 resistant variant. h) JP 1352 2008. i) JP 1588 2011. j) JP 1320 2014. k) NL RIVM 1990. l) NL K8-94 1994. m) NL 152037 2001. n) NL 2051181 2005. o) NL 21051825 2010.



Supplementary Figure 3. Modeling differences in the capsid interior between HPeV3 strains. a) Position of asymmetric unit of HPeV3 in a rear slice of the capsid, showing capsid proteins VP0 (blue), VP3 (green) and VP1 (pink) (other protein units are partially transparent). b) Close-up view of asymmetric unit with all variation in amino acid residues colored red (not minimized). c-o) Differences in amino acid residues between HPeV3 strains compared to prototype A308/99 (red), modeled as described in Materials and Methods: c) AUS 178608 2013. d) AUS 162090 2015. e) AUS 166178 2015. f) JP A308/99 prototype WT. g) JP A308/99 resistant variant. h) JP 1352 2008. i) JP 1588 2011. j) JP 1320 2014. k) NL RIVM 1990. l) NL K8-94 1994. m) NL 152037 2001. n) NL 2051181 2005. o) NL 21051825 2010.



Supplementary Figure 4a) Analysis of the neutralizing activity of a human AT12-015 mAb and a rabbit HPeV3 hyperimmune polyclonal serum (HPeV3 pAb) against chloroform-treated HPeV3 A308/99 wild-type (wt) and MAR HPeV3 variant in LLCMK2 and HT29 cells. b) Immunofluorescence imaging of LLCMK2 cells infected with a subset of HPeV3 clinical isolates and stained by the AT12-015 mAb.

	10	20	30 40	50	60 7	70 80	90	100	110 12	20 1	.30 1	140 1	.50 16	0 170	180	190	200 210	2.	20
								
NL_RIVM_1990	NSWGSQMDLTDPLCIED	ONMENCKQSISPN	ELGLTSAQDDGPLGN	EKPNYFLNFRTMN	VDIFTVSHTKVDN	IFGRAWYVTSHDFNNO	GDTWRQKLTFP	KEGHGMLSQFFA	YFTGEINIHILY	MAEQGFLRV	AHTYDTEDNE	RKTFLSSNGVI	TIPAGEOMTLS	VPFYSNKPLRTVR	ESALGFLMCRP	MMHGTTRTTAEVY	VSLRCPNFFFPVPAP	KPTGSR	AIALY
NL_K894_1994	••••••	•••••••••••	•••••	•••••	••••••	•••••	•••••	•••••	•••••			••••••		•••••	D	••••••••••••••••••••••••••••••••••••••	•••••		.T
TD 3208 00 1000		••••••		•••••	•••••		•••••	•••••				••••••		•••••	D	с	•••••		.TS
TC062408 1999				•••••			•••••	•••••							D	БV Т.			.15
10062409 2000				•••••											D 1	т.			F
EU077509 2000	~~~~~~~~~	~~~ X													D		Τ		A
EU077507_2000		X			R										D		т		Α
NL 152037 2001						Α									D		Ι		. A
AJ889918 2001															D		Τ		Α
LC062411 2001															D	LI			s
DQ172451 2002																	I		. AX~~~
D0172448 2002															D		I	G	. AX~~
D0172445 2002		~~													D		I	G	. AX~~
DQ172444 2002		·~													D		I		. <u>AX</u> ~~
DQ172443 2002		~													D		I	G	. AX ~~
JX219572 2003									· · · · · · · · · · · · · · · ·					I				т.	.V.FN
LC129269 2003															D		I	G	.AV
FJ652380_2003				•••••			• • • • • • • • • • • •		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·						D		I		. A
LC062416_2004				•••••					• • • • • • • • • • • • • •						D		I		. A
DQ172449_2004		~~	•••••	•••••	• • • • • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • •		• • • • • • • • • • •		• • • • • • • • • • • • • •	D	•••••	I	• • • • • • •	. VX~~
DQ172447_2004		~~	•••••	•••••	• • • • • • • • • • • • • •	••••••	•••••	•••••	••••	• • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	•••••	• • • • • • • • • • •	•••••	D	•••••	I	G	.vx~~
DQ172446_2004		~~	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	••••••	• • • • • • • • • • • •	••••••	• • • • • • • • • • • • •	••••••	D	• • • • • • • • • • • • • • • •	1	G	. VX~~
FJ3/3152_2004		~~	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••		• • • • • • • • • • • • •	••••••	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	•••••	D	•••••	1	G	.v
FJ3/3151_2004		·~·	•••••	•••••	••••••	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	• • • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • • •		•••••	D	•••••	±		.AF
ET373140 2004		····	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	• • • • • • • • • • • • •	••••••		•••••	D	•••••	±	G	. V V
ET373149_2004			•••••	•••••	•••••		•••••	•••••				••••••		•••••	D		T		. v v
ET373147 2004			GPK		•••••			•••••							D		т	G	v
FJ373146 2004															D	Т			.TS
FJ373145 2004		~~													D		I	G	.v
FJ373144 2004		~~													D		I	X. G	.v
FJ373143 2004		·~													D	L			.TS
FJ373142 2004		~~ 													D		I	G	.v
FJ373141_2004		~~													D		I	G	.v
FJ373140_2004		·~							· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·						D		I	G	.v
FJ373139_2004		~~		•••••			• • • • • • • • • • • •		• • • • • • • • • • • • •						D		I		. A
FJ373138_2004		~~	•••••	•••••		• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • • • •			• • • • • • • • • • •			D		I		.AV
FJ373137_2004		~~	•••••	•••••	• • • • • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • • •	•••••	••••	• • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • • • • • •	D	• • • • • • • • • • • • •	I	• • • • • • •	.тн
LC129273_2004	••••••••••••••••	• • • • • • • • • • • • • •	•••••	•••••	• • • • • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •		• • • • • • • • • • • • • • •	D	•••••	I	G	. AV
LC062418_2005	••••••••••••••••	• • • • • • • • • • • • • •	•••••	•••••	• • • • • • • • • • • • • •	•••••	• • • • • • • • • • • •	•••••	•••••	• • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	•••••	• • • • • • • • • • • •	•••••	D	•••••	I	G	. AV
NL_2051181_2005	••••••	• • • • • • • • • • • • • • • •	•••••	•••••	• • • • • • • • • • • • • • •	•••••	• • • • • • • • • • • •	•••••	•••••		• • • • • • • • • • • •	•••••	•••••	•••••	D	•••••	I	G	.A
LC062421_2006			•••••	•••••	• • • • • • • • • • • • • • • •		•••••	•••••	•••••	K					D		±	G	.AV
FJ373198_2006	~~~~		•••••	•••••	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •		•••••	•••••	•••••			• • • • • • • • • • • •			D	•••••	1	G	.A
FJ373162_2006		·~····································	•••••	•••••	• • • • • • • • • • • • • • • •		•••••	•••••	•••••			•••••			D		±		VA
ET373160_2006				•••••			•••••	•••••							D		т	G	
FT373159 2006															D	т.			TS
FJ373158 2006		~~													D		Τ	G	. A
FJ373157 2006		~~													D		I		.A
FJ373156 2006		~~ .													D		I	G	.A
FJ373155 2006		~~													D		I	G	VA
FJ373154 2006		~~													D		I	G	.A
FJ373153_2006		·~															I	т.	FH
KM986843_2007			•••••	•••••					• • • • • • • • • • • • • • • •						D		I	G	. AV
KC887310_2007	·····V	• • • • • • • • • • • • •	•••••	•••••	• • • • • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • •		• • • • • • • • • •		• • • • • • • • • • • • • •	D	•••••	I	G	. AV
GQ203502_2007	•••••••••••••••••	v.	•••••	•••••	• • • • • • • • • • • • • •	•••••	•••••	••••••	•••••	••••••	••••••	•••••	• • • • • • • • • • • •	•••••	D	• • • • • • • • • • • • • • • •		G	. AV
LCU62425_2008		•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	••••••	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	•••••	D	•••••	1	G	. AV
JU229434_2008		••••••••••	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	• • • • • • • • • • • • •	••••••	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	••••••	D	•••••	±		.AV
MB/39185_2008			•••••	•••••			•••••	•••••	•••••		• • • • • • • • • • • • •	••••••		•••••	D	•••••	±	G	.AV
TP 1352 2008				•••••				•••••							D		т.	G	AV
10229436 2009					P										D		т	G	Δ
TX682576 2010															D		T		Α
E655453 2010															D		IX.		AV.
Q229442 2010															D		I		. AV
X826607 2010															D		I		. AV
L 21051825 2010															D	I.	I	G	.AR
C062430 2011															D		I	G	.T.H
C887318_2011															D		I		. AV
JQ229463_2011							• • • • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • • • • • • •							D		I		. AV
AB759146_2011				•••••				•••••			••••••	••••••			D		I	G	.T.,H
JP_1588_2011		• • • • • • • • • • • • •	•••••	•••••		•••••		• • • • • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • • • • •	•••••		• • • • • • • • • • • •		•••••	D		I	G	.T.,H
KT626009_2011	•••••••••••••••••	• • • • • • • • • • • • • • • •	•••••	•••••	R	•••••	• • • • • • • • • • • •	•••••	•••••	••••••	••••••	•••••	• • • • • • • • • • • •	•••••	D	•••••	I		. AV
KC887321_2012	•••••••••••••••	• • • • • • • • • • • • •	•••••	•••••	R	•••••	• • • • • • • • • • • •	•••••	• • • • • • • • • • • •	•••••	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •		• • • • • • • • • • • • • • • •	D	•••••	I		. AV
AUS_178608_2013	••••••••••••••••	••••••••••	•••••	•••••	R	•••••	•••••	•••••	•••••	••••••	• • • • • • • • • • • •	••••••	• • • • • • • • • • • •	•••••	D	• • • • • • • • • • • • • • • •	I	••••G	.A.FH
KXU68679_2013		••••••	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••		••••••	••••••	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	•••••	D	•••••	1		. AV . H
10062437_2014	••••••••••••••••••	•••••••••••	•••••	•••••	••••••	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	••••••	••••••		•••••	D	•••••	1 T	G	. AV
10028025 2014		••••••••••	•••••	•••••			•••••	•••••	•••••	•••••	••••••	••••••		•••••	D	•••••	±	G	.AV
10064069 2014				•••••				•••••							D		T	G	AV
LC064070 2014			•••••												D	P	т.	G	AV
LC064071 2014															D		Τ		AV
C027501 2014															D		I		AV
P772256 2014						к									D	¥	I	.R	A.FN
LC027469 2014															D		I		. AV
JP 1320 2014															D		I	G	. AV
AUS 162090 2015															D		I		A.FH
AUS 166178 2015															D		I	G	A FH

Supplementary Figure 5. Alignment of HPeV3 VP1 amino acid sequences from GenBank. HPeV3 strains are identified by the accession numbers and the year of isolation. Sequences generated in this study are highlighted in red.

Supplementary table 1. HPeV genotyping primers (RIVM).

#	Forward, 5'- 3'	Reverse, 5'–3'
1	TNMGNATGGGNTTYTTYCCNAAY	ARTARTCNARYTCRCAYTCYTC
2	GAGTTGGACAATGCCATCTAYACNATNTGYG	GTTCCTGTTAGAGCTGTCTTRAAnATRTCRTC

Supplementary table 2. HPeV3 P1 sequencing primers.

#	Forward, 5'– 3'	Reverse, 5'–3'
1	CCGTAGGTAACAAGTGRC	CAGTTCCTTGGTTGACRTT
2	GGAGACAARAACCCCAGTAA	CYGAAAGAGGYGTCCAAACA
3	CTAGGCAGTACRAAATAACC	ACTACTACTTGAAGGTGTGG
4	CTAATGAGGTTGATGTYACAGT	GAGAAGGARTATGGTATAGTCAA
5	CAATCTGTGGCTTCAGTGG	GTCAACATTCATAGTTCTGAAG
6	CACTTGGATGAGGAAGACACA	AAGRAACCCCTGCTYTGCC
7	CCKTTGGGTAATGAGAAACCA	AAYTGATATACAYTMTCTCCTA