**figure 4\_supplement 2**

**CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment for Aldh1a2 “enh1” enhancer**

**Predicted Tbx5 sites CIS-BP: score >10, score >8**

xenTro9 GTGACTAGCCTTTTGCTATTAAATTTGAACAATGGGCTCTCTAGGTGCTT---------GATGGTGATTTACATGGAAACAAGCTCTGCTTTTGCAAGAGGCAGC-CT-----------T

galGal6 GTGAGTAGCCTTCGCAATTG-AGGTTGAACAATGAACTCACTGGGTGTTGTCCAATTTGTAGCATGATTTACATGGAAGCAAGCCCTTCTTTTTTCTAGGGTTATCCCTTTTTCATCTGG

hg38 ---------------------------------GAACTCTCTGGGTGTTGTCCAATTTGTAACATGATTTACATGGAAGCAAGCCCTTCCTT-TCCCGGGGTTATCCCTTTTTCATCTGG

mm10 ---------------------------------GAACTCTCTGGGTGTTGTCCAATTTGTAACATGATTTACATGGAAGCCAGCCCTTCCTT-TCTTAGGGTTATCCCTTTTTCATCTGG

\* \*\*\* \*\* \*\*\*\* \* \* \*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\* \* \*\*\* \*\* \* \*\* \*\* \*

xenTro9 CACTGATAGTTATATATTTTTTCTCTCCAGATAGGATCACTTCATGTCACATAGTTTCTCTGATTTACAGACTTCCCTTACAACAATCACTATAAATTAGAAAGTGGGGGAGGAATGGAA

galGal6 TGTTTAGGATGGGTTATATATAATCCATAGATAGGAACATTTGCTGTCAAATATTCTACCTGATTTAGAGTTAGCCTTTACCACGGTCACTATAAATAAGGGAGA---------GAAAAA

hg38 TGTTTAGGACGGGTTATATATAATCCATAGATAGGAACATTTGCTGTCAAATACTTTTGCTGATTTAGAGCTAGGCCACAGAATGGTCACTATTAATAAAGAAGGAG------------A

mm10 TGTTTAGGACGGGTTATATATAATCCATAGATAGGAACATTTGCTGTCAAATACGCTGGCTGATTTAGAGCTAGGCCACTAAATGGTCACTATTAATAAAGAGGGAGGGAGAGAGAGAGA \* \* \*\*\* \* \* \*\* \*\*\*\*\*\*\*\* \*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\*\* \* \*\*\*\*\*\*\*\* \*\* \* \* \*\*\*\*\*\*\* \*\*\* \* \* \*

xenTro9 TCTA-----ATTTAAGCTTTGCAGGGATTCCTTGTGTTTTCTTGCA**ATGTGTCA**TCACTTGTCCACTACATGGCATTTTTATGAAGTGACCATAATGAAAGTCAGATTAAATGTGCAGGC

galGal6 AAAAAAAAAACAATTTGAGGCTTTGCAGGGATTCCTTGTTCTTGCA**ATGTGTCA**TCGCTTGTCCATTTCATGGCGTTTTTACGAAGTGGCCATAATGAAAGTCAGATTAAATGTACAGGA

hg38 AAAAAAAAACTAATCTGAGACTTTGCAGGGATTCCAGGTTCTTGCT**ATGTGTCA**TCGCTTGTCCAGTCTGTGGCGGTTTTATGAAGTGGCCATAATGAAAGTCAGATTAAATGCACAGGA

mm10 AAAAAAATTCTCATCTGAGACTTTGCAGGGATTCCAGGTTCTTGCT**ATGTGTCA**TCGCTTGTCCAGCCCATGGCGGTTTTACGAAGTGACCATAATGAAAGTCAGATTGAATGCACAGGA

\* \* \* \*\* \*\*\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*\*\*\* \*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\* \*\*\*\* \*\*\*\*

**Tbx site 1** **Mutant:** **AAAAAAAA**

xenTro9 TATATACATTTAATCAACAGCCATCAGAGTCTGTATAGCTGGAGGAGTTCTAAAAAGCCCCCAGTGAATGCACATTTGCTGCGAAAA---AATTTGGGCTTGGTGGTATGGATGTGTGCA

galGal6 TATATATGTTTAATCAACAGCCGTTGGTGTCAGTACTGCTGGAAGAGTTATAAAAGCCCCCGTGAATGCA--AATTTATTGCAAAAGAATCCAAGTCTTA--GTGGTAGGAATATCTATG

hg38 TATATACATTTAATCAACAGCCATTGGAGTCTGTGGTGCTGGAAGAGTTATAAGAGCCCCATG-AATGCA--AACTTATTGCAAAAGAATTCAAGGGGTG--GGGGAATGAATGTCTGCT

mm10 TACATACATTTAATCAACAGCCATTGGAGCCTGGAGTGCTGCAAGAGTTATAAGAGCCCTGTG-AATGCA--AATTTATGGTGAAAGAATCCAAGGGGCGGGAGGAGATGGATGTCTGCT

\*\* \*\*\* \*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\* \* \* \* \* \* \*\*\*\* \* \*\*\*\*\* \*\*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\*\* \* \* \* \*\* \* \*

xenTro9 GACTGGTACTACCTGACACAGAACACTT-CAGAAATTTAAAAGTGAGTTATTTACGTGTAAGGTTTTCCTTGTAAACCCAACAGCTGGTGGTTTTCAAGACTTGAAACTGTTCCAGAACA

galGal6 GAATGGTACTACCTGACACAGAACACCT-AAAACTTTCAGAAATGAATTATTTAAGTGTAAGGTTTTGCTTGTAAAGCCGCCAGCTGCTGGATTTCAAGACTTGAAACCGTTCCAAAACA

hg38 GAATGGTACTACCTGACACAGGACACCAAAAAACTTTCCAGAGTGAATGATTTAAGTGTAAGGTTTGGCTTGTAAAGCTGCCAGCTGCTTGGTTTCAAAACTTGAAACGTTTCCAAAACA

mm10 GAATGGTACTACCTGACACGGGACACCAAAAGACTTTCCAGAGTGAGGGATTTCAGTGTAAGGTTTGGCTTGTAAAGCTGCCAGCTGCTTGGTTTCAAAACTTGAAACATTTCCAAAACC

\*\* \*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\* \* \*\*\*\* \* \* \*\* \* \*\*\* \*\*\*\* \*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*\*\*\* \* \*\*\*\*\*\* \* \* \*\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*

xenTro9 TGAGATGAGGCACTTAATACACACACACGCCCAAGTAAACGCTATGATTTTTACAGCCAATTTAAATGCGATCAACTTGCATTAATAAGAAATTAATGGTGATGCCGTGGTTTGTTTTAG

galGal6 CGGGACTAGGTACTTTATGTGTGCACTAGAGTAAATACTCTG-----ATTTTACTGCCAATTTAAATGTGCTCAGTTTACAGTAATGAGCTTGTATAGGCAATACCTTGTTTATAGAAAG

hg38 TTGGATGAGGCACTTTATATGTGCACTAGAGTAAATACTCTG-----GTTTTACTGCCAATTTAAATGTGCTCAGTTTACAGTAATGAGCTTGTATAGGCATTACCTTGTTTATAGAAAG

mm10 TTAGACAAGGCACTTTATACACGCACTAGAGTAAATACTCTG-----GTTTTACTACCAATTTAAATGTGCTCAGTTTACAGTAATGAGCTTGTATAGGCATTACCTTGTTTATAGAAAG \*\* \*\*\* \*\*\*\* \*\* \*\*\* \* \*\* \*\* \* \*\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\* \* \*\*\* \*\* \*\* \*\*\*\* \*\* \*\* \*\* \* \*\* \*\* \*\* \*\*

xenTro9 AGTAAAATGGTGGGGGAAAT---AGTTTGTTCCTGTTGCTATTTAATGTGTCACACTATGATGGGGTTTGCTTTTGTTCTAAGTGATTTGGGTGCTTCAGTGAAACTTCTTGCAGGCCCT

galGal6 TGGAACAGGAAGAAACTAACATTAACCATTAACAGTAGCGATTTCTCTTGCCTTCAACTCTAACTTTATACCAAATAGATCATTCCCATGTCTTATCTGAAATATTTGCCATAATTATTC

hg38 TGGAACAGGAAGAAATGAACATTAACCATTACCAGTAGCAATTCCCATTGCCTTCTACCACAATAT-----TGATGGCAAGTTTAATTTCTTCCAATTTGGGACTGTGTCACAACTGACA

mm10 TGGAACAGGAAGAAATGAACATTAACCAGGACCGGTAGCAGTTCCCATTGCCTTCTGCAACACGGACGGACGGATGGCGAGTCTAGTTTCTTCCAGTTTGGAACTATGTCACAACTGATA \* \*\* \* \* \* \*\* \* \* \*\* \*\* \*\*

**Tbx site 2** **Mutant:** **AAAAAAAAA**

xenTro9 GTTTCCGCAAACATGAAAAAAATTTGCTATGCCACACACTATGAATGGCTTGTAGATTTTATTATATAGTCTATTTGATAGATTTTCCCAGTGGTTTTTAAGGCTTTTAAACTTTGCATT

galGal6 TTTTTCTAAATCTGTGAGATAGATGGA----GCATTCAGTAAAATACACCTTGTAGTCCCAGTCAACGCGCACTGCAAAACTCTTCTGTAATTCCAAGGCACTGTTTCTTATTTTAAGAA

hg38 TTGGTGT--GTATTTGGCTTTAATGTCATGTTGCTTCAGCAGAGGAACACATGCTGTGATTCAGCTTGCCTCTGTCAAGGCTGATCAGACCAGTTAGTTGTTTCTTACTGTTTTTCCTAA

mm10 CTGGTGTGTGTGCTTGGCTTTGATGCCATGTTGCTCCAACAGAGTCCCAGATGCTGTCATCCAACCAGCTTCTATCAAAGCCACCCACTAGA-----CTGTGTCTTACTATTTTTAGTAT

xenTro9 CCACTTTCTAGGTATTCTCTCAAAATTTTACCCTAATGCAGACTATCCTCCCCAATATATACTGTGGGCCCCACAGGGAGCTATCCCTAAAGCTTAAAATCACTGTACTAGACTGATGTT

galGal6 CACGATCATGTTCTGCGTACAGGCAAAACTGTTGATAGGTGCTCCTCTCAGCAGAACGTAGTTAACATTTTTAAAATCTCTTTAAGAAAGAACAGACCACTTCTGTAAGGGAAAAGTACT

hg38 AACAGATGTCAAGAGACAGATATGGGAATTCTGGGACAGTAGAATAGGTAGGTACCCTGATTACACGTAACTGGGTCTGTTTTAGCCAAGTCTGTTTTCTACAAATGGATCACTCATGGG

mm10 AGCAGATGCAAGTAG-CACAGTTAGGAATTATGGGACAGT-----------------AGAGTATACATAATTGGTTTTGTTTTAGCCAAGCCTGCTTTCTATAAGTGATTTGGTCTCAGG

**Tbx site 3** **Mutant:** **AAA**

xenTro9\_dna TTGGTCTGTCTA

galGal6\_dna AAACTGCAGTTG

hg38\_dna AGCCATTTATTT

mm10\_dna AGTCATTTATTT

**AAAAA ­**