Table S1. Synthetic Enhancer Cassettes, Related to Figure 1

| Cassette | Length | Sequence | | | |
|-----------|--------|--|--|--|--|
| Spacer 19 | 19 | CTAGCTCCGGCCAGACTCG | | | |
| Spacer92 | 92 | CTAGAATCTCCGCGCGCTGCGCGCGGATCGCCTGCACGGAGCTGGGTCCGGCCAGACTCGAGCTTTGCGCCACCGTGAGGTCTCGGCCCACACG GTCGGCGCTTCGCAGCGTACCTAGGAGG | | | |
| Spacer64 | 64 | CTAGCTCCGCGCGCGCGCGCGGATCGCCTGCACGGAGCTGGGTCCGGCCAGACTCGAGCTTTG | | | |
| I-Tet | 25 | CTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGAG | | | |
| 2-Tet | 60 | CTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGATCCGGCCAGACTCGAGACTCTATCATTGATAGAGTG | | | |
| 3-Tet | 95 | CTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGATCCGGCCAGACTCGAGACTCTATCATTGATAGAGTCCGCGAGCCTCCGACATCCCTATCAGTGATAGAGAGCGCGCGAGCCTCCGACATCCCTATCAGTGATAGAGAGAG | | | |
| 3-Tet-S | 125 | CTAGAATCCGGTCGGCTCCCTATCAGTGATAGAGATCCGGCCAGACTCGAGACTCTATCATTGATAGAGTCCGCGAGCCTCCGACATCCCTATCAGT GATAGAGACCCAGCCGCGTACCTAGGAGG | | | |
| 6-Tet | 190 | CTCCCTATCAGTGATAGAGATCCGGCCAGACTCGAGACTCTATCATTGATAGAGTCCGCGAGCCTCCGACATCCCTATCAGTGATAGAGAGCTAGCT | | | |
| 2-Tet-10 | 60 | CTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGACTCCGCGCGCGCGCGGGATCGCCTGCACGGAGCG | | | |
| 2-Tet-01 | 60 | CTAGCCTCCGCGCGCGCGCGGATCGCCTGCACGGAGC ACTCTATCATTGATAGAGTG | | | |
| 3-Tet-110 | 95 | CTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGATCCGGCCAGACTCGAGACTCTATCATTGATAGAGTCTCCGCGCGCTGCGCGGGATCGCCTGCACGGAGCGCGCGC | | | |
| 3-Tet-101 | 95 | CTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGACTCCGCGCGCGCGCGCGCGGATCGCCTGCACGGAGCCCGCGAGCCTCCGACATCCCTATCAGTGATAGAGAG | | | |
| 3-Tet-011 | 95 | CTAGCCTCCGCGCGCGCGGATCGCCTGCACGGAGCACTCTATCATTGATAGAGTCCGCGAGCCTCCGACATCCCTATCAGTGATAGAGAGG | | | |
| 3-Tet-100 | 95 | CTAGC TCCCTATCAGTGATAGAGATTGGGTCCGGCCAGACTCGAGCTTTGCGCCACCGTCTCCGCGCGCG | | | |
| 3-Tet-010 | 95 | CTAGC TGGGTCCGGCCAGACTCGAGCTTTGCGCCACCGTG ACTCTATCATTGATAGAGTCTCCGCGCGCGCGGGATCGCCTGCACGGAGCG | | | |
| 3-Tet-001 | 95 | CTAGCCTCCGCGCGCGCGGATCGCCTGCACGGAGCGAGCGAGGTCTCGGCCCACACGGTCGGCGCTTCGCAGCATCCCTATCAGTGATAGAGAGAG | | | |

Table S3. Sequences Used for Figure 2B, Related to Figure 2

| L (bp) | Sequence (1 - TetR binding sites - Tet02) | | | |
|--------|---|--|--|--|
| 150 | GCTCACAATTGCACCAACATGGTGCTTAATGTTTCCATTGAAGCACTATATTGGTGCAACATTGTCTTCGACGCTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGATTGGGTCCGGCCAGACTCGAGCTTTTGCGCCACCGTCTCCCGCGCGCG | | | |
| 115 | GCTCACAATTGCACCAACATGGTGCTTAATGTTTCCATTGAAGCACTATATTGGTGCAACATTGTCTTCGACGCTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGACTCCGCGCGCG | | | |
| 114 | GCTCACAATTGCACCAACATGGTGCTTAATGTTTCCATTGAAGCACTATATTGGTGCAACATTGTCTTCGACGCTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGAGCTAGCAGCGCGGGAGATTCTAGCCCCCTTTTCGAGGAACGTCCCCATGATAACGCCTCTTTTAGGGGCACATTTAAAAGTTGGCACAGATTTCGCTT | | | |
| 95 | GCTCACAATTGCACCAACATGGTGCTTAATGTTTCCATTGAAGCACTATATTGGTGCAACATTGTCTTCGACGCTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGAGCTAGCCCCTTTTCGAGGAACATTCCCCCATGATAACGCCCTTTTAGAGGCACAGATTTCGCTT | | | |
| 66 | GCTCACAATTGCACCAACATGGTGCTTAATGTTTCCATTGAAGCACTATATTGGTGCAACATTGTCTTCGACGCTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGAGCTGCGCCTTTTAGGGGGCAATTAAAAGTTGGCACAGATTTCGCTT | | | |
| 63 | GCTCACAATTGCACCAACATGGTGCTTAATGTTTCCATTGAAGCACTATATTGGTGCAACATTGTCTTCGACGCTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGAGCTAGCT | | | |
| 53 | GCTCACAATTGCACCAACATGGTGCTTAATGTTTCCATTGAAGCACTATATTGGTGCAACATTGTCTTCGACGCTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGAGCTAGCAATTTAAAAGTTGGCA | | | |

| L (bp) | Sequence (2 - TetR binding sites - Tet02/Tet01) | | | |
|--------|---|--|--|--|
| 181 | GCTCACAATTGCACCAACATGGTGCTTAATGTTTCCATTGAAGCACTATATTGGTGCAACATTGTCTTCGACGCTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGATCCGGCCAGACTCGAGACTCTATCATTGATAGAGT GCTAGCCGGACCCAGCTCCGTGCAGGCGATCCGCGCGCGC | | | |
| 150 | GCTCACAATTGCACCAACATGGTGCTTAATGTTTCCATTGAAGCACTATATTGGTGCAACATTGTCTTCGACGCTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGATCCGGCCAGACTCGAGACTCTATCATTGATAGAGTTCCGCGCCCGCGCGCG | | | |
| 149 | GCTCACAATTGCACCAACATGGTGCTTAATGTTTCCATTGAAGCACTATATTGGTGCAACATTGTCTTCGACGCTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGATCCGGCCAGACTCGAGACTCTATCATTGATAGAGTGCTACCATTGATAGAGTTCCGCTTTTCGACGAGCCCCAGACTCGAGACTCTATCATTGATAGAGTTGCCACAGATTTCACTTGATAGAGTTTCGCTT | | | |
| 130 | GCTCACAATTGCACCAACATGGTGCTTAATGTTTCCATTGAAGCACTATATTGGTGCAACATTGTCTTCGACGCTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGATCCGGCCAGACTCGAGACTCTATCATTGATAGAGTGCCCCTTTTCGAGGAACACTCCCATGATAACGCCCTTTTAGGGGCAATTTAAAAGTTGGCACAGATTTCGCTT | | | |
| 115 | GCTCACAATTGCACCAACATGGTGCTTAATGTTTCCATTGAAGCACTATATTGGTGCAACATTGTCTTCGACGCTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGATCCGGCCAGACTCGAGACTCTATCATTGATAGAGTGCTACCATTGATAGAGTTCCCCTATCAGTGATAACGCCTTTTAAGAGTTCGCACACATTTTCGCTT | | | |
| 101 | GCTCACAATTGCACCAACATGGTGCTTAATGTTTCCATTGAAGCACTATATTGGTGCAACATTGTCTTCGACGCTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGATCCGGCCAGACTCGAGACTCTATCATTGATAGAGT | | | |
| 98 | GCTCACANTIGCACCAACATGGTGCTTAATGTTTCCATTGAAGCACTATATTTGGTGCAACATTGTCTTCGACGCTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGGTCCGGCCAGACTCGAGACTCTATCATTGATAGAGT GCTAGCTTTTAAGGGCCATTTAAAAGTTGGCACAGATTTCACTT | | | |

| L (bp) | Sequence (3 - TetR binding sites - Tet02/Tet01/Tet02) |
|--------|---|
| 252 | GCTCACAATTGCACCAACATGGTGCTAATGTTCCATTGAAGGACTATATTGGTGCAACATTGCTTCGACGCTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGATCCGGCCAGACTCTATCATTGATAGAGGTCCGCGAGGCCTCCACACTCCTATCAGTGATAGAGAGCTAGCAACACCCCATCGATAAACGCCAACACCCCATCACAACACCCCAACACCCCAACACCCCAACACCCCAACAC |
| 216 | GCTCACAATTGCACCAACATGGTGCTTAATGTTTCCATTGAAGCACTAATTGGTGCAACATTGTCTTCCACGCTAGCTCCTATCAGTGATAGAGATCCGGCCAGACTCTATCATTGATGAGGTCCGCGAGACTCTATCATTGATGAGGTCCGCGAGACTCCGTACAGTGATAGAGGTCCGGCGAGACTCCGTACAGTGATAGAGGTCCGGCGAGACTCCGTACAGTGATAGAGGTCGGCAACATTCGCTTTTCGAGGAACGTCCCTATCAGTGATAGAGGTCGGCAACATTCGCTTTTAAAAGTTTGGCACAGATTTCGCTT |
| 184 | GCTCACATTGCACCAACATGGTGCTTAATGTTCCATGAAGGACTATATTGGTGCAACATTGCTTCGACGCTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGATCCGGCCAGACTCTATCATTGATAGAGTCCGCGAGACTCTATCATTGATAGAGTCCGCGAGACTCTATCATTGATAGAGTCCGCGAGACTCCTATCAGTGATAGACAGCTAGAGAACTCCGAGAACTCTATCATTGATAGAGTCCGCGAGACTCTATCATTGATAGAGTCCGCGAGACTCCTATCAGTGATAGACAGCTAGAGAACTCCGAGAACTCTATCATTGATAGAGTCCGCGAGACTCTATCATTGATAGAGTCCGCGAGACTCTATCAGTGATAGACAGCTATCAGTGATAGACAGCTTAGAGTAGAGAACTCCGAGAACTCCATATCAGTGATAGACAGCTTAGAGAGTCCGAGAACTCTATCATTGATAGAGTCCGCGAGACTCTATCATTGATAGAGTCCGCGAGACTCCTATCAGTGATAGACAGCTTAGAGTAGAGAACTCCGAGAACTCTATCATTGATAGAGTCCGCGAGACTCTATCATTGATAGAGTCCGCGAGACTCTATCATTGATAGAGTCCGCGAGACTCTATCATTGATAGAGTCCGCGAGACTCTATCATTGATAGAGTCCGCGAGACTCTATCATTGATAGAGTCCGCAGACTCCTATCAGTGATAGACAGCTTAGAGAGACTCTATCATTGATAGAGTCCGCGAGACTCTATCATTGATAGAGTCCGCAGACTCTATCATTGATAGAGTCCGCAGACTCTATCATTGATAGAGTCCGCAGACTCTATCATTGATAGAGTCCGCAGACTCTATCATTGATAGAGTCCGCAGACTCTATCATTGATAGAGTCCGCAGACTCTATCATTGATAGAGTCCGCAGACTCTATCATTGATAGAGTCCGCAGACTCTATCATTGATAGAGTCCGCAGACTCTATCATTGATAGAGTCCGCAGACTCTATCATTGATAGAGTCCGCAGACTCTATCATTGATAGAGTCCGCAGACTCTATCATTGATAGAGTCAGAGACTCTATCATTGATAGAGTCCGCAGACTCTATCATTGATAGAGTCCGCAGACTCTATCATTGATAGAGTCAGAGACTCTATCATTGATAGAGAACTCTATCATTGATAGAGTCCGCAGACTCTATCATTGATAGAGAACTCTATCATTGATAGAGTCCGCAGACTCTATCATTGATAGAGAACTCTATCATTGATAGAGAACTCATCATTAGAGTCAGAGAACTCTATCATTGATAGAGAACTCATATCATTAGAGTATAGAGAACTCATATCATTAGAGTCAGAGAACTCATATCATTAGAGAACTCATAGAGAACTCAGAACTCATAGAGAACTCATATCATTAGAGAACTATCATTAGAGAACTCATAGAGAACTCATAGAGAACTATCATAGAGAACTATCATTAGAGAACAACAACAAACA |
| 165 | GCTCACANTIGCACCAACATGGTGCTTAATGTTCCATTGAAGCACTATATTGGTGCAACATTGTCTTCGACGCTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGATCCGGCCAGACTCGAGACTCTATCATTGATAGAGTCCGCGAGCCTCCGACATCCCTATCAGTGATAGAGATCCGGCCAGACTCGAGACTCTATCATTGATAGAGTCCGCGAGCCTCCGACATCCCTATCAGTGATAGAGACCTATCAGTGATAGAGACCTCGAGACTCCGAGACTCCGAGACTCCGAGACTCCGAGACTCCGAGACTCCGAGACTCCGAGACTCCGTATCAGTGATAGAGACCTATCAGTGATAGAGACCTATCAGTGATAGAGACCTATCAGTGATAGAGACCTCGAGACTCCGAGACACACAC |
| 150 | GCTCACANTIGCACCAACATGGTGCTTAATGTTTCCATTGAAGCACTATATTGGTGCAACATTGTCTTCGACGCTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGATCCGGCCAGACTCGAGACTCTATCATTGATAGAGTCCGCGAGACTCTATCATTGATAGAGTCCGCGAGACTCCTATCAGTGATAGAGACCTATCAGTGATAGAGACCTATCAGTGATAGAGACCTATCAGTGATAGAGACCTATCAGTGATAGAGACCTATCAGTGATAGAGACCTATCAGTGATAGAGACCTATCAGTGATAGAGACCTATCAGTGATAGAGACCTATCAGTGATAGAGACCTATCAGTGATAGAGACCTATCAGTGATAGAGACCTAGCAGACATCCCTATCAGTGATAGAGACCTAGCAGACTCCGAGACTCCGAGACTCCGAGACTCCCTATCAGTGATAGAGACCTAGAGAACTCGAGAGACTCTATCAGTGATAGAGACCTAGAGAACTCGAGAGACTCGAGACATCCCTATCAGTGATAGAGACCTAGAGAACTCGAGAGACTCGAGACCTCGAGACTCCAGAGACTCCGAGACTCCGAGACTCCGAGACTCCGAGACTCCGAGACTCCGAGACTCCGAGACTCCAGAGACTCCGAGACCTCGAGACATCCCTATCAGTGATAGAGAGCCTAGAGAGACCTAGAGAACACAGAGACTCGAGACACAGACTCCAGAGACCTCGAGACACACAC |
| 136 | GCTCACATTGCACCAACATGGTGCTTAATGTTCCATTGAAGCACTATATTGGTGCAACATTGTCTTCQACGCTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGATCCGGCCAGACTCGATCAGTGATAGAGTCCGCGAGACTCTATCATTGATAGAGTCCGCGAGCCTCCGACATCCCTATCAGTGATAGAGACCAACATTTTGATAGAGTCCGCGAGACTCCGACATCCCTATCAGTGATAGAGACCAACATTTTGATAGAGTCCGCGAACATCCCTATCAGTGATAGAGACCAACATTTTTAAAAGTTCGCACAACATTTTCATTTTTTTAAAAGTTCGCACAACATTTTCATTTTTTTT |
| 133 | GCTCACAATTGCACCAACATGGTGCTTAATGTTTCCATTGAAGCACTATATTGGTGCAACATTGTCTTCQACGCTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGATCCGGCCAGACTCGATACAGTGATAGAGTCCGCCAGACTCGATACAGTGATAGAGACCTATCATTGATAGAGTCCGCGAGACTCCGTATCAGTGATAGAGAGACCTATCAGTGATAGAGACCT |
| 123 | GCTCACANTIGCACCAACATGGTGCTTAATGTTTCCATTGAAGCACTATATTGGTGCAACATTGTCTTCQACGCTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGATCCGGCCAGACTCTATCATTGATAGAGTCCGCGAGACTCCTATCAGTGATAGAGACCTATCATTGATAGAGTCCGCGAGACTCCTATCAGTGATAGAGACCTATCAGTGATAGAGACCTATCA |

Table S4. Biochemical Parameters from the Literature, Related to Figure 5

| Parameter | Value | Reference |
|-----------------|--------------|--------------------------------|
| K_{TD}^{NS} | 1 mM bp | (Kleinschmidt et al., 1988) |
| K_{TO1}^S | 10 pM | (Lederer et al., 1995) |
| K_{ATO1}^{S} | 1 nM - 10 nM | (Lederer et al., 1995) |
| K_{ATAO1}^{S} | 3 μM – 1mM | (Lederer et al., 1995) |

Table S5. Parameters Used for Fits with Model Level 4, Related to Figure 6

| Parameter | Value 1-Tet | Value 2-Tet | Value 3-Tet |
|--|---------------|---------------|---------------|
| T_0 | 351 molecules | 351 molecules | 351 molecules |
| Kat | 100 pM | 360 pM | 360 pM |
| K_{TD01} | 100 pM | 100 pM | 100 pM |
| K_{TD02} | 15 pM | 15 pM | 15 pM |
| K_{ATD01} | 0.7 nM | 0.7 nM | 0.7 nM |
| K_{ATD02} | 7.5 nM | 7.5 nM | 7.5 nM |
| $\omega_s = \left(\omega_{tt}^s, \omega_{at}^s, \omega_{aa}^s\right)$ | NA | (1,0,0) | NA |
| $\overline{\boldsymbol{\omega}_{l}} = \left(\boldsymbol{\omega}_{tt}^{l}, \boldsymbol{\omega}_{at}^{l}, \boldsymbol{\omega}_{aa}^{l}\right)$ | NA | (1,0,0) | (1,0.1,0.1) |