

Table S1. Synthetic Enhancer Cassettes, Related to Figure 1

Cassette	Length	Sequence
Spacer19	19	CTAGCTCCGGCCAGACTCG
Spacer92	92	CTAGAATCTCCGCGCTGCGCGGGATCGCCTGCACGGAGCTGGGTCCGGCCAGACTCGAGCTTTGCGCCACCGTGAGGTCTGGCCACACG GTCGGCGCTTCGCAGCGTACCTAGGAGG
Spacer64	64	CTAGCTCCGCGCTGCGCGGGATCGCCTGCACGGAGCTGGGTCCGGCCAGACTCGAGCTTTG
1-Tet	25	CTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGAG
2-Tet	60	CTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGATCCGGCCAGACTCGAGACTCTATCATTGATAGAGTG
3-Tet	95	CTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGATCCGGCCAGACTCGAGACTCTATCATTGATAGAGTCCGCGAGCCTCCGACATCCCTATCAGTGATAGAGAG
3-Tet-S	125	CTAGAATCCGGTCCGCTCCCTATCAGTGATAGAGATCCGGCCAGACTCGAGACTCTATCATTGATAGAGTCCGCGAGCCTCCGACATCCCTATCAGT GATAGAGACCAGCCGCTACCTAGGAGG
6-Tet	190	CTCCCTATCAGTGATAGAGATCCGGCCAGACTCGAGACTCTATCATTGATAGAGTCCGCGAGCCTCCGACATCCCTATCAGTGATAGAGAGCTAG CTCCCTATCAGTGATAGAGATCCGGCCAGACTCGAGACTCTATCATTGATAGAGTCCGCGAGCCTCCGACATCCCTATCAGTGATAGAGAGCTAG
2-Tet-10	60	CTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGACTCCGCGCTGCGCGGGATCGCCTGCACGGAGCG
2-Tet-01	60	CTAGCCTCCGCGCTGCGCGGGATCGCCTGCACGGAGC ACTCTATCATTGATAGAGTG
3-Tet-110	95	CTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGATCCGGCCAGACTCGAGACTCTATCATTGATAGAGTCTCCGCGCTGCGCGGGATCGCCTGCACGGAGCG
3-Tet-101	95	CTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGACTCCGCGCTGCGCGGGATCGCCTGCACGGAGCCCGAGCCTCCGACATCCCTATCAGTGATAGAGAG
3-Tet-011	95	CTAGCCTCCGCGCTGCGCGGGATCGCCTGCACGGAGC ACTCTATCATTGATAGAGTCCGCGAGCCTCCGACATCCCTATCAGTGATAGAGAG
3-Tet-100	95	CTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGATTGGGTCCGGCCAGACTCGAGCTTTGCGCCACCGTCTCCGCGCTGCGCGGGATCGCCTGCACGGAGCG
3-Tet-010	95	CTAGCTGGGTCCGGCCAGACTCGAGCTTTGCGCCACCGTG ACTCTATCATTGATAGAGTCTCCGCGCTGCGCGGGATCGCCTGCACGGAGCG
3-Tet-001	95	CTAGCCTCCGCGCTGCGCGGGATCGCCTGCACGGAGCGAGGTCTCGGCCACACGGTCCGCGCTTCGACGATCCCTATCAGTGATAGAGAG

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

L (bp)	Sequence (1 - TetR binding sites - Tet02)
150	GCTCACAATTGCACCAACATGGTGCTTAATGTTCCATTGAAGCACTATATTGGTGCAACATTGTCTTCGACGCTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGATTGGGTCGGCCAGACTCGAGCTTTGCGCCACCGCTCCGCGCGCTGCGCGGATCGCTGCACGGAGCGTAGCTCCCATGATAACGCCTTTAGGGCAATTTAAAGTTGGCACAGATTTTCGCTT
115	GCTCACAATTGCACCAACATGGTGCTTAATGTTCCATTGAAGCACTATATTGGTGCAACATTGTCTTCGACGCTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGACTCCGCGCGCTGCGCGGATCGCTGCACGGAGCGTAGCTCCCATGATAACGCCTTTAGGGCAATTTAAAGTTGGCACAGATTTTCGCTT
114	GCTCACAATTGCACCAACATGGTGCTTAATGTTCCATTGAAGCACTATATTGGTGCAACATTGTCTTCGACGCTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGACTAGCAGCGCGGGAGATTCAGCCCTTTTCGAGGAACGTCCCATGATAACGCCTTTAGGGCAATTTAAAGTTGGCACAGATTTTCGCTT
95	GCTCACAATTGCACCAACATGGTGCTTAATGTTCCATTGAAGCACTATATTGGTGCAACATTGTCTTCGACGCTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGACTAGCCCTTTTCGAGGAACGTCCCATGATAACGCCTTTAGGGCAATTTAAAGTTGGCACAGATTTTCGCTT
66	GCTCACAATTGCACCAACATGGTGCTTAATGTTCCATTGAAGCACTATATTGGTGCAACATTGTCTTCGACGCTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGACTAGCGCTTTTAGGGCAATTTAAAGTTGGCACAGATTTTCGCTT
63	GCTCACAATTGCACCAACATGGTGCTTAATGTTCCATTGAAGCACTATATTGGTGCAACATTGTCTTCGACGCTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGACTAGCTTTTAGGGCAATTTAAAGTTGGCACAGATTTTCGCTT
53	GCTCACAATTGCACCAACATGGTGCTTAATGTTCCATTGAAGCACTATATTGGTGCAACATTGTCTTCGACGCTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGACTAGCAATTTAAAGTTGGCACAGATTTTCGCTT

L (bp)	Sequence (2 - TetR binding sites - Tet02/Tet01)
181	GCTCACAATTGCACCAACATGGTGCTTAATGTTCCATTGAAGCACTATATTGGTGCAACATTGTCTTCGACGCTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGATCCGGCCAGACTCGAGACTCTATCATTGATAGAGTCTAGCGCCAGCCAGCTCCGCGCGATCCGCGCGAGCGCGGAGATCTAGCCCTTTTCGAGGAACGTCCCATGATAACGCCTTTAGGGCAATTTAAAGTTGGCACAGATTTTCGCTT
150	GCTCACAATTGCACCAACATGGTGCTTAATGTTCCATTGAAGCACTATATTGGTGCAACATTGTCTTCGACGCTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGATCCGGCCAGACTCGAGACTCTATCATTGATAGAGTCCGCGCGCTGCGCGGATCGCTGCGCGGATCCGCGCGAGCGTAGCTCCCATGATAACGCCTTTAGGGCAATTTAAAGTTGGCACAGATTTTCGCTT
149	GCTCACAATTGCACCAACATGGTGCTTAATGTTCCATTGAAGCACTATATTGGTGCAACATTGTCTTCGACGCTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGATCCGGCCAGACTCGAGACTCTATCATTGATAGAGTCTAGCGCCAGCCAGCTCCGCGCGATCCGCGCGAGCGTAGCTCCCATGATAACGCCTTTAGGGCAATTTAAAGTTGGCACAGATTTTCGCTT
130	GCTCACAATTGCACCAACATGGTGCTTAATGTTCCATTGAAGCACTATATTGGTGCAACATTGTCTTCGACGCTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGATCCGGCCAGACTCGAGACTCTATCATTGATAGAGTCTAGCCCTTTTCGAGGAACGTCCCATGATAACGCCTTTAGGGCAATTTAAAGTTGGCACAGATTTTCGCTT
115	GCTCACAATTGCACCAACATGGTGCTTAATGTTCCATTGAAGCACTATATTGGTGCAACATTGTCTTCGACGCTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGATCCGGCCAGACTCGAGACTCTATCATTGATAGAGTCTAGCGCTCCCATGATAACGCCTTTAGGGCAATTTAAAGTTGGCACAGATTTTCGCTT
101	GCTCACAATTGCACCAACATGGTGCTTAATGTTCCATTGAAGCACTATATTGGTGCAACATTGTCTTCGACGCTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGATCCGGCCAGACTCGAGACTCTATCATTGATAGAGTCTAGCGCTTTTAGGGCAATTTAAAGTTGGCACAGATTTTCGCTT
98	GCTCACAATTGCACCAACATGGTGCTTAATGTTCCATTGAAGCACTATATTGGTGCAACATTGTCTTCGACGCTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGATCCGGCCAGACTCGAGACTCTATCATTGATAGAGTCTAGCTTTTAGGGCAATTTAAAGTTGGCACAGATTTTCGCTT

L (bp)	Sequence (3 - TetR binding sites - Tet02/Tet01/Tet02)
252	GCTCACAATTGCACCAACATGGTGCTTAATGTTCCATTGAAGCACTATATTGGTGCAACATTGTCTTCGACGCTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGATCCGGCCAGACTCGAGACTCTATCATTGATAGAGTCCGGCCAGCTCCGACATCCCTATCAGTGATAGAGAGCTAGCGCCAGCCAGCTCCGCGCGATCCGCGCGAGCGCGGAGATCTAGCCCTTTTCGAGGAACGTCCCATGATAACGCCTTTAGGGCAATTTAAAGTTGGCACAGATTTTCGCTT
216	GCTCACAATTGCACCAACATGGTGCTTAATGTTCCATTGAAGCACTATATTGGTGCAACATTGTCTTCGACGCTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGATCCGGCCAGACTCGAGACTCTATCATTGATAGAGTCCGGCCAGCTCCGACATCCCTATCAGTGATAGAGAGCTAGCGCCAGCCAGCTCCGCGCGATCCGCGCGAGCGCGGAGATCTAGCCCTTTTCGAGGAACGTCCCATGATAACGCCTTTAGGGCAATTTAAAGTTGGCACAGATTTTCGCTT
184	GCTCACAATTGCACCAACATGGTGCTTAATGTTCCATTGAAGCACTATATTGGTGCAACATTGTCTTCGACGCTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGATCCGGCCAGACTCGAGACTCTATCATTGATAGAGTCCGGCCAGCTCCGACATCCCTATCAGTGATAGAGAGCTAGCGCGCGGAGATCTAGCCCTTTTCGAGGAACGTCCCATGATAACGCCTTTAGGGCAATTTAAAGTTGGCACAGATTTTCGCTT
165	GCTCACAATTGCACCAACATGGTGCTTAATGTTCCATTGAAGCACTATATTGGTGCAACATTGTCTTCGACGCTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGATCCGGCCAGACTCGAGACTCTATCATTGATAGAGTCCGGCCAGCTCCGACATCCCTATCAGTGATAGAGAGCTAGCCCTTTTCGAGGAACGTCCCATGATAACGCCTTTAGGGCAATTTAAAGTTGGCACAGATTTTCGCTT
150	GCTCACAATTGCACCAACATGGTGCTTAATGTTCCATTGAAGCACTATATTGGTGCAACATTGTCTTCGACGCTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGATCCGGCCAGACTCGAGACTCTATCATTGATAGAGTCCGGCCAGCTCCGACATCCCTATCAGTGATAGAGAGCTAGCGCTCCCATGATAACGCCTTTAGGGCAATTTAAAGTTGGCACAGATTTTCGCTT
136	GCTCACAATTGCACCAACATGGTGCTTAATGTTCCATTGAAGCACTATATTGGTGCAACATTGTCTTCGACGCTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGATCCGGCCAGACTCGAGACTCTATCATTGATAGAGTCCGGCCAGCTCCGACATCCCTATCAGTGATAGAGAGCTAGCGCTTTAGGGCAATTTAAAGTTGGCACAGATTTTCGCTT
133	GCTCACAATTGCACCAACATGGTGCTTAATGTTCCATTGAAGCACTATATTGGTGCAACATTGTCTTCGACGCTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGATCCGGCCAGACTCGAGACTCTATCATTGATAGAGTCCGGCCAGCTCCGACATCCCTATCAGTGATAGAGAGCTAGCTTTAGGGCAATTTAAAGTTGGCACAGATTTTCGCTT
123	GCTCACAATTGCACCAACATGGTGCTTAATGTTCCATTGAAGCACTATATTGGTGCAACATTGTCTTCGACGCTAGCTCCCTATCAGTGATAGAGATCCGGCCAGACTCGAGACTCTATCATTGATAGAGTCCGGCCAGCTCCGACATCCCTATCAGTGATAGAGAGCTAGCAATTTAAAGTTGGCACAGATTTTCGCTT

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 μ M - 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
K_{at}	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
$\overline{\omega}_s = (\omega_{it}^s, \omega_{at}^s, \omega_{aa}^s)$	NA	(1,0,0)	NA
$\overline{\omega}_l = (\omega_{it}^l, \omega_{at}^l, \omega_{aa}^l)$	NA	(1,0,0)	(1,0.1,0.1)