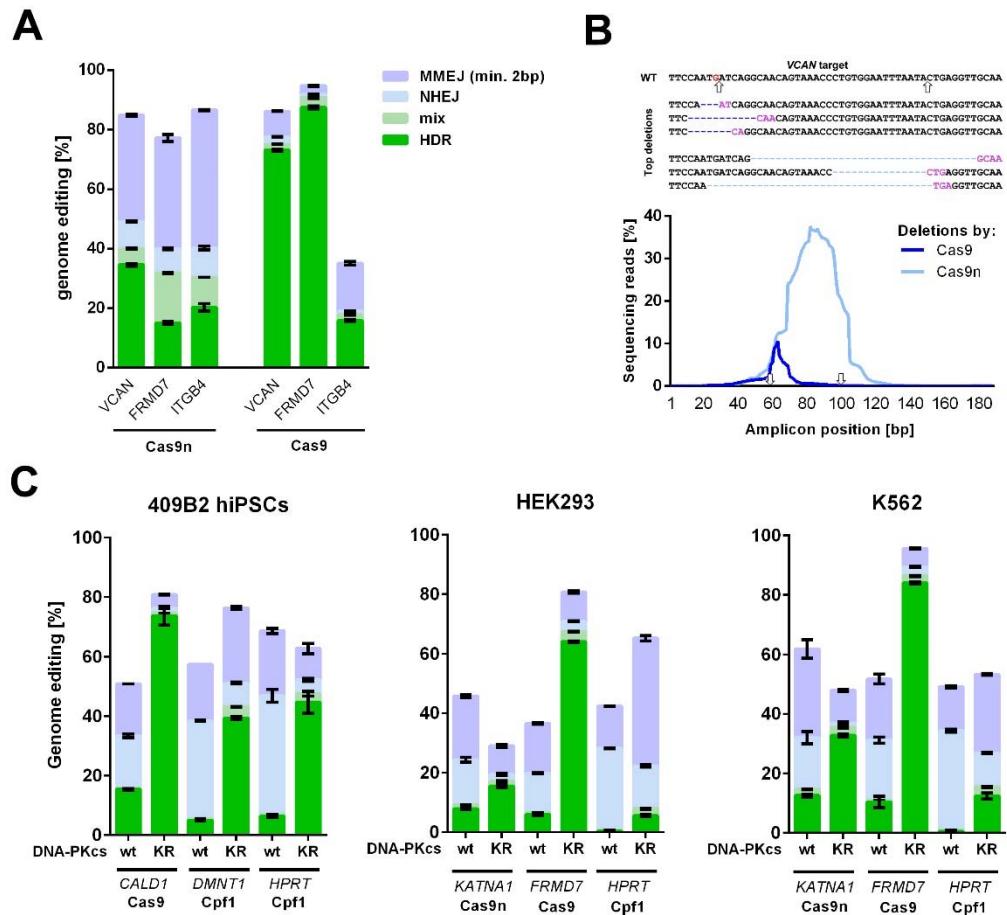
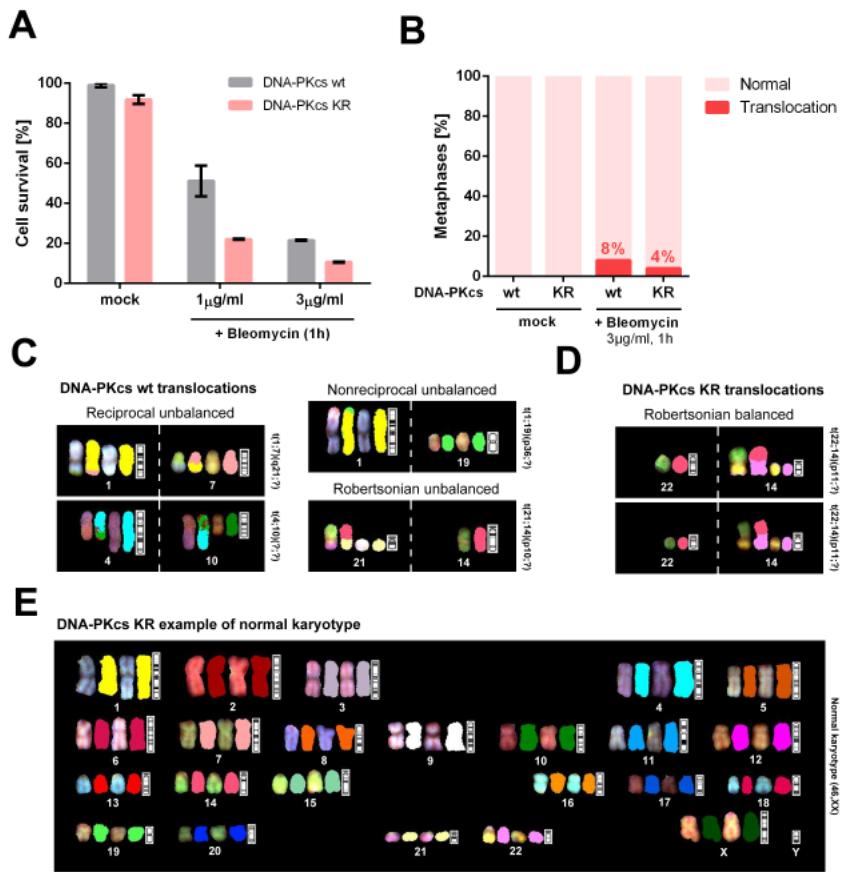


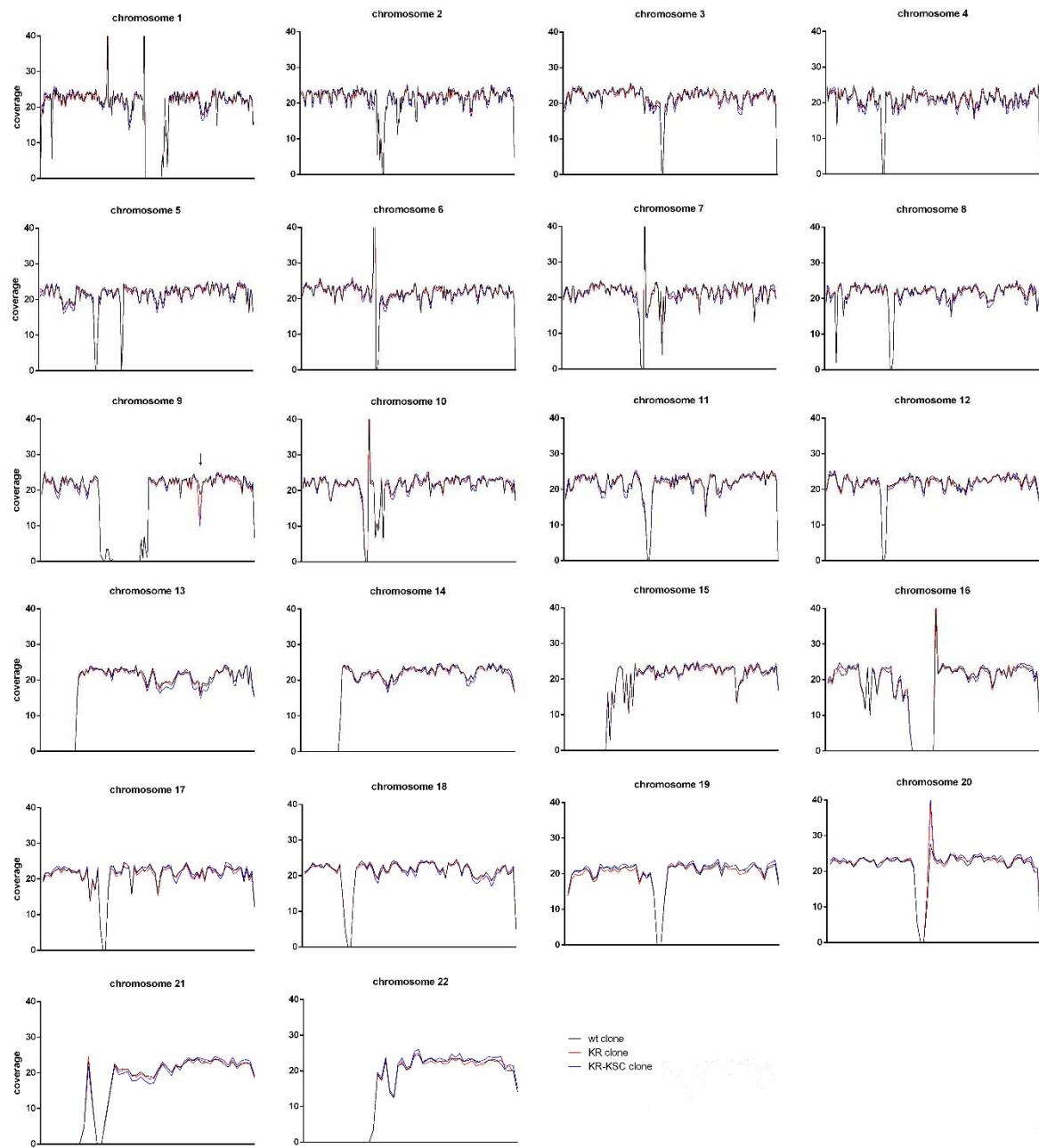
Supplementary Data



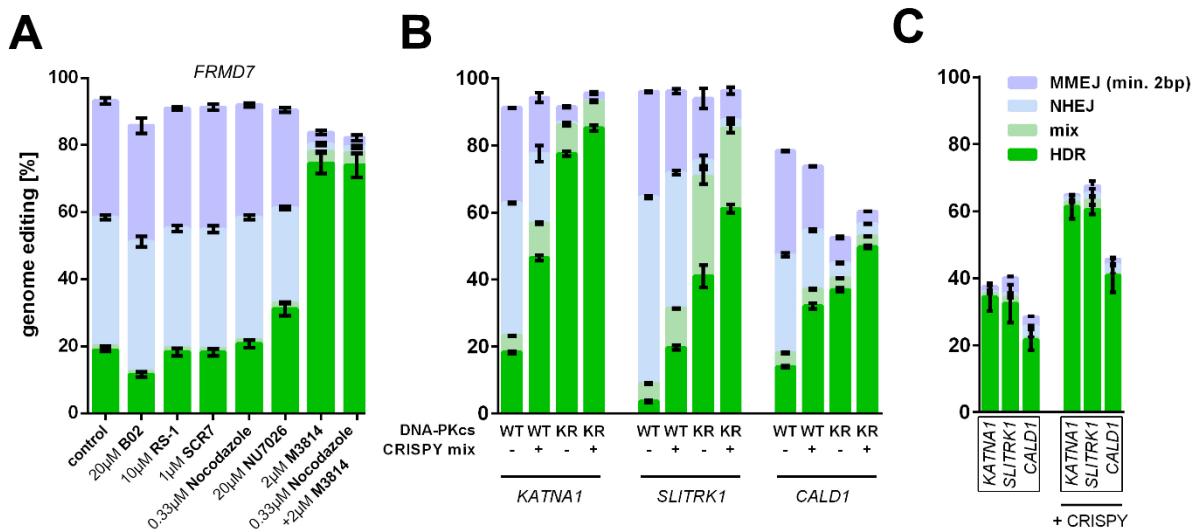
Supplementary Fig. 1. Frequency of genome editing in different DNA-PKcs K3753R cell lines using different CRISPR enzymes. (A) Genome editing of three genes with Cas9n (iCRISPR) and with Cas9 protein in 409B2 hiPSCs. (B) Patterns of deletions after editing with Cas9n and Cas9 in the gene VCAN as an example. Both nicking sites are indicated by arrows, the left one was used also for Cas9. The three most abundant deletions are shown for Cas9 (dark blue) and the bottom three for Cas9n (light blue). Microhomologies are indicated in pink. (C) The genome editing frequencies in cells expressing the DNA-PKcs wildtype (WT) or DNA-PKcs KR mutant for different recombinant CRISPR enzymes in 409B2 hiPSCs, HEK293 cells, and K562 cells. HDR, HDR with indels, NHEJ, and MMEJ are indicated in green, light green, light blue, and light purple, respectively. Error bars show the SEM of two replicates for A and four replicates for C.



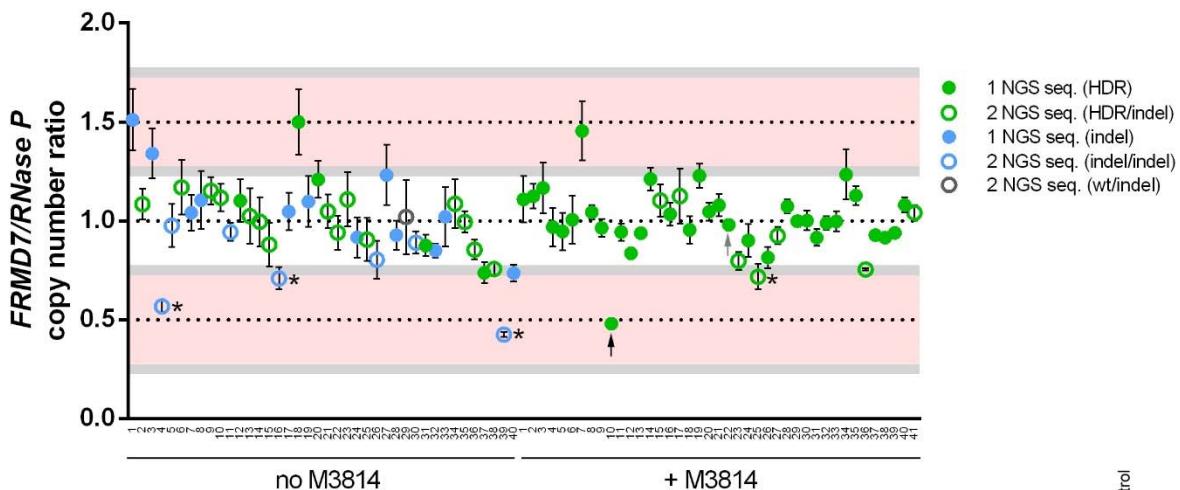
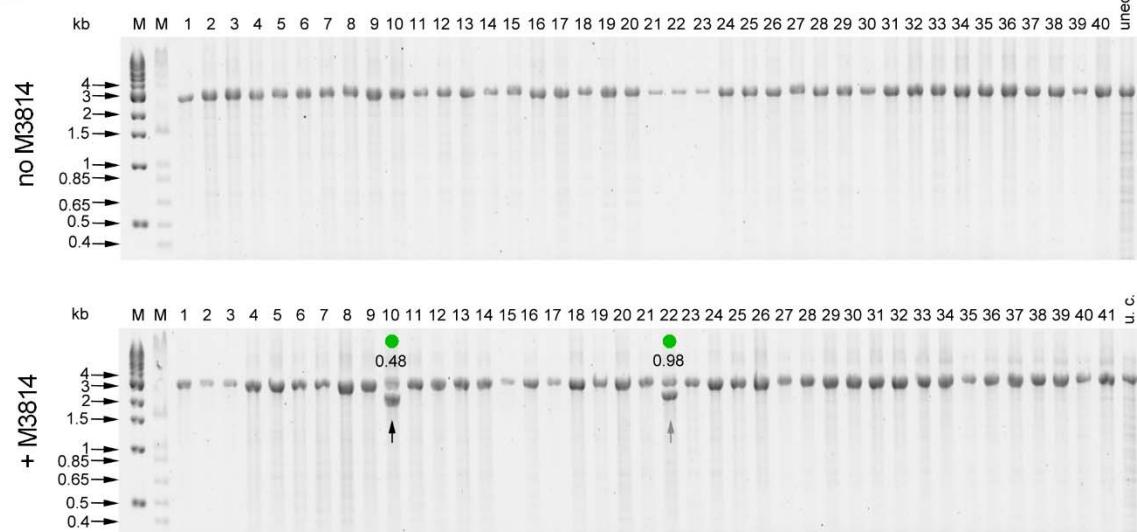
Supplementary Fig. 2. Impact of bleomycin treatment on DNA-PKcs wildtype (WT) and DNA-PKcs KR cells.
(A) Cell survival as measured by the resazurin assay after bleomycin treatment. Error bars show the SEM of two replicates. **(B)** Spectral karyotyping (SKY) of cells after treatment with 3 µg/ml bleomycin. **(C)** The translocations observed for DNA-PKcs WT cells; and **(D)** DNA-PKcs KR cells. **(E)** An example of the majority of normal metaphases observed.



Supplementary Fig. 3. Base coverage along the chromosomes for the WT, KR, and KR-KSC hiPSC lines. Coverage was calculated for 1Mb windows, using unique genomic regions. WT, KR, and KR-KSC are indicated as a grey, red, and blue lines, respectively. A 1Mb region on chromosome 9 (arrow) carries a heterozygous deletion in the KR and KR-KSC lines.



Supplementary Fig. 4. Effect of small molecules and the CRISPY mix (17) on genome editing efficiency in 409B2 hiPSCs. **(A)** Effect of RAD51 inhibitor B02, RAD51 enhancer RS-1, disputed DNA ligase IV inhibitor SCR7, cell cycle inhibitor Nocodazole (removed after 16h to achieve cell cycle synchronization), and DNA-PK inhibitors NU7026 and M3814, on genome editing of *FRMD7* with Cas9 RNP. **(B)** Genome editing of *KATNA1*, *SLTRK1*, and *CALD1* in DNA-PKcs WT and KR cells with or without CRISPY small molecule mix using doxycycline inducible Cas9n (iCRISPR). **(C)** Simultaneous editing of the three genes (framed) with and without the CRISPY mix. Histogram designations as in Suppl. Fig. 1. Error bars show the SEM of four replicates for A, three replicates for B and two replicates for C.

A**B**

Supplementary Fig. 5 *FRMD7* gene copy number analysis in 409B2-hiPSCs edited with or without M3814.
(A) Copy number ratio between *FRMD7* and the control gene *RNase P* based on a TaqMan quantitative PCR assay. Each circle represents a cellular clone. Closed circles represent clones where amplicon sequencing yields a single DNA sequence (HDR: green; indels: blue), open circles indicate two DNA sequences of similar read number (HDR/indel mix: green; indel/indel: blue; wildtype/indel: grey). Asterisks indicate clones where a heterozygous deletion identified by DNA sequencing is expected to interfere with binding of the TaqMan probe (min. 5nt mismatch), resulting in copy number ratios below the expectation of the diploid state. Error bars show the SEM of at least four technical replicates. **(B)** Long range PCR of the *FRMD7* target locus for each clone. Arrows indicate two clones carrying heterozygous big deletions and the respective TaqMan assay copy number ratio is stated. The +M3814 clone 22 has a deletion and a copy number ratio of 0.98, suggesting a gain of one copy of the target locus in this clone as well.

Supplementary Table 1. Oligonucleotides used in this study. gRNA (gRNA 20mer target) and single stranded DNA donors (ssODNs) for editing, as well as primers for analysis are shown. Mutations are in bold letters and ancestral mutations are underlined. The gRNAs with an asterisk were used for Cas9 cleavage.

	KATNA1 t1	AAATGATGACCCTTCCAAAA
	KATNA1 t2	CAACACCTAAAATAAGGTA
	SLC8A1 t1	GAGTCTCTTATTCCCAGT
	SLC8A1 t2	CAGATGAAATCCCATTGAAA
	TTLL5 t1	CGTGGCAGGCCAGTAGGGCT
	TTLL5 t2	CGATCAGGAAGTCACACCAT
	SV2C t1	GCAGAGGTTTAATGACATCA
	SV2C t2	TGCATTGCTAACAGAACATG
	GPR132 t1	CCATGAAGACAGACGTCCC
	GPR132 t2	TTTCCACCCCTATGGATTCC
	PRDM10 t1	TCATCACCAACCACCAAC
	PRDM10 t2	TCTGCTGTTGGCTGTTGGTC
	RB1CC1 t1	TGAGAAAAGACAGACAAAAAT
	RB1CC1 t2	CTTCGTATTCCTCTTCTTG
	SLITRK1 t1	GCTAACAGTTACCTGCC
	SLITRK1 t2	ACCCGTCGCTATCGCTGCTG
gRNAs	SSH2 t1	CAGATCCTCAGGAGGGCCA
	SSH2 t2	GTGGTCAAACCTCCAGCACCT
	CSGALNACT1 t1	CTCATTTTCTCGACCATT
	CSGALNACT1 t2	GCCGTTGAATTCTGTTTG
	CALD1 t1*	TGGAGACTATTGCTGTTGA
	CALD1 t2	GCAGTATAACCAGTCAATTG
	VCAN t1*	GTTCACTGTTGCCTGATCAT
	VCAN t2	CCCTGTGGAATTAACTTG
	ITGB4 t1	GGGTCCTGGGGTGGCAGAT
	ITGB4 t2*	CCGCAGCTGGGCA GCCGTGC
	FRMD7 t1	AGCCAGCTGAAAGAACCCA
	FRMD7 t2*	GTGGGCTCTACATAGCTATG
	PRKDC t1	GGTCCTGCCACCCCTTCACC
	PRKDC t2	GCGCGTGGAGCAGCTTTCC
	PRKDC t1back	GGTCCTGCCACCTCTCACC
ssODNs	DNMT1 t1 (Cpf1)	CTGATGGTCATGCTGTTAC
	HPRT t1 (Cpf1)	GGTTAAAGATGGTTAAATGAT
	KATNA1 Cas9n	CTCATCTATCCCCAGGGAAAATTAGTAGCTGCCAGAACATAACCATTAGAAGGGTCA TCATTTCAGAACCTCCAACACCTAAATAACGGTAAGGGGAGAGTGAAGAAAGATATT AAAGTTGGATTATACCAATGAAGCT
	SLC8A1 Cas9n	TTCATTCTCTCCATTTGTCAGCAATTACATGGTCACATGAGAAAATAAGA GACTACAATAACTAACAGATGAAATCCCATAAGAAAGTGGGTGAAAGACTTAATGCC GCATGTTGACATGACACTTCCA
	TTLL5 Cas9n	CTGCCAGTGCTTCTCCCTGCCACATCCGGGGCACAGAACATCCCAAGCCCTGCTGGC CTGCCACGCTGTCAGAACAGTCACACCCATTGGTCCCCTTC
	SV2C Cas9n	ACATTCTTCAGGTCTGGTACATGGATTATCCGTTGGTCCCTGACGTCTTAAACA TCTGCAGTCCGATGAATATGCAATTGCTAACACAGAAATGTGAGAGAGATAAAAT
	GPR132 Cas9n	GCCACGGGGCAGTCAGCTCCCTGGTCCCTGCTGTGGGTGAGCCTGGTAAACGCTGT CTTCATGGACCAACTGTTCCACCCCTTATGATTCTGGACACTTCTGGCGGAAATGGTC CGTGGCCAGCACGTAGATAATG
	PRDM10 Cas9n	GGAGTCAGGTCGAGCCACCTGACACAGTGACTCCCTGGACCCCCAGACCCACAGCCA ACAGCAGACCAACAGTACATCATCACCAACACCAACGGGAACGGAAACGGCAGC
	RB1CC1 Cas9n	AAGCTCTGAATTACTGTTCTGCTGCTCTGGCTGCTGACCAATTGTGTITGTCTT TCTCAAGGTTCTGATAATAGCTTCGTTCTCTTCTGGTAATTTCATCTTTT CTCTTCAAGGACACTCAATTCTGA

	TCATCTTAAACCCGACCCCTGGATGTGGTCGCAGCTGCAGCCCCCAGGGCATGGTAAA CTGTTAGCTAAGGTTGTTCTGGCTACCGTCGCTATGCAGCTGGTGGGCTGATT TTGATCTGCCAGTGGCTGGGATCTTGACTCCG
	ATCTGACCCCTGGGCCCTCTGAGGATCTGGAAGCTGGTCAAACCTCCAGCACCTGGGAG CTGGAACAGTGGCATCTGCTCAGAACATGGGACAGTGAGCCAGGCCCA
	GTTGGCCATGTTGAGCTTTCATTTTCACTTGATGGGGCGAATGGACAGCTGGAAATAAG ACGAGCCGTTGTAATCGTGTGTTGGTCCCCTTGAAAGGTGAGCTCATACA
	TTATATGTATGTGTTACTTTAGCAGTGGTCAATCGACCCATCAAGCTGCA <u>G</u> TAGT CTCCAAGATTGACAGCAGACTGGAGCAGTACCAAGTGTATTGAGGTGAGAATTGCT CAGCGTTATGGTCTGCTGAACAGAAATAGA
	GTACTACTGCTCCAGTGTGTCATCTGGAGACTACTGCTGCTTGATGGTCATTGA CACCACGTCTAAAAAGTAACACATACA
	GATAGCAGCATCAGAACAGCAAGTGGCAGCGAGAATTCTGATTCCAAT <u>A</u> TCAGGCAAC AGTAAACCTGTGAATTAAACTGAGGGTGCACACCAC
	CCTGAAACTCAACGAGCTTAATCAGAGGGCAGGATTCCACGATAGCAGCATCAGAACAG CAAGTGGCAGCAGAACATTCTGATTCCAAT <u>A</u> TCAGGCAACAGTAACCCGTGGAATTAA ATACTG
	TGGTGTATGCTGCTGACTCGCTTGCGAGCGGGTGTGGAAGAGCCCGCA <u>T</u> GGCTGCC AGCTCGGGGAAGGGTCTGGGCTGGGAGATAGCCAGTCAGAGGG
	CTCACCAACTAGGAAGGGCTCGGTGGCGCTGGTGTGGTGGTGTGATGCTGCTGTACT CGCTTTCAGCGGGGTGTGGAAGAGCCCGCA <u>T</u> GGCTGCCAGTCAGGGAAAGGGTCC TGGGTTGGG
	AGGTGCCAGATGGTCCCCTAGAGCAGAGGAAAGGACAAGTCC <u>A</u> TAGCTATGTA GAGCCACTGCAATGAAGCCAGCTGAAAGAACGCCAAAGGAATATCAGAATG
	TATGCCTCCCCAGGTCTTTTATGTGGAACAGCCACCCAGGTGCCAGATGGTCCC AATTAGAGCAGAGGAAGGACAAGTCC <u>A</u> TAGCTATGAGAGCCACTGCAATGAAGCC AGCTGAA
	GCAGAGGCCAACAGCGCATCATCCGTGGCATGACAGAGGGAACACCCCTTCTGG TGA <u>A</u> GGGTGGCAGGACCTGCGCAGGACCAGCGCGTGGAGCAGCTTCCAGGTCA GAATGGGATCCTGGCCAAAG
	GCAGAGGCCAACAGCGCATCATCCGTGGCATGACAGAGGGAACACCCCTTCTGG TGA <u>A</u> GGGTGGCAGGACCTGCGCAGGACCAGCGCGTGGAGCAGCTTCCAGGTCA GAATGGGATCCTGGCCAAAG
	TTAACATCAGTACGTTAATGTTCTGAT <u>C</u> GTCATGTCGTGTTAGTCGCCTGTCAGTGGC GTGACACCAGGGCGTGTCCCAGACTGAC
	GCCATTCACATAAAACTTTAGTTAGATGGTTAAATGA <u>A</u> TGACAAAAAAAGTAATT CACTTACAGTCTGGCTTATATCCAACAC
	KATNA1 forward CCTGACGGCAAAGGAATATAG
	KATNA1 reverse ACTGTGCTTCCTGTATTGTTGT
	SLC8A1 forward AAGAAGGGCTTGGGGTCC
	SLC8A1 reverse TGCCCTCTCCCCCATCTT
	TTLL5 forward CCTTGCCACCATTCTCTT
	TTLL5 reverse CTTGCTGAAGAGGGACGAG
	SV2C forward GGGAGTTGCTATTGCCCT
	SV2C reverse ACCTGCCATTGCGTATTCCA
	GPR132 forward GCCTGGAGAAGGTGTAGTGG
	GPR132 reverse CAGCCTCTGTGGTGGTCTG
	PRDM10 forward ACAGACATGAGGTGGGTGCT
	PRDM10 reverse TCAGAATTGGAAGAAAGCAA
Primers	RB1CC1 forward GGGCAGTCTGAATAGCTTCATC
	RB1CC1 reverse TTTGCATAACCAAGCATTGA
	SLITRK1 forward GGGCTCAAATCAGCCAAG
	SLITRK1 reverse TTTCAAGACAAATGGGCAAG
	SSH2 forward TCAGGACTCCTTCCTGCTGT
	SSH2 reverse GCACCAAAAGGGAAAAGTGA
	CSGALNACT1 forward GATGCTGTCAGTGGTCAGGA
	CSGALNACT1 reverse TCTTACCGTGCAGAACAGAGGAG
	CALD1 forward GCTAACATCAGCTAGCATATGTATGAGAA
	CALD1 reverse TTGGACTTGTGATTATGCTTAAGTG
	VCAN forward GGCAGGATTCCACGATAGCA
	VCAN reverse CGTGCCTTCCACTGACTCTT
	ITGB4 forward CCATAGAGTCCCAGGTGG
	ITGB4 reverse GTGCTCACCCACTAGGAAGG

<i>FRMD7</i> forward	TGCTCCTACCGCTAGTCCTG
<i>FRMD7</i> reverse	GGTATTATGCCTCCCCAGGT
<i>PRKDC</i> forward	CTAGCCTGTGCCCTGAGATG
<i>PRKDC</i> reverse	GCACAACGCTATAAGGTCTCA
<i>DNMT1</i> forward	TGAACGTTCCCTTAGCACTCTG
<i>DNMT1</i> reverse	CCTTAGCAGCTTCCTCCTCC
<i>HPRT</i> forward	GGTAAAAGGACCCCACGAA
<i>HPRT</i> reverse	TGGCAAATGTGCCTCTACAAAT
Illumina adapter forward 5'	ACACTCTTCCTACACGACGCTTCCGATCT
Illumina adapter reverse 5'	G TGACTGGAGTTAGACGTGTGCTTCCGATCT
<i>FRMD7</i> for. (long range)	AGGCCAGAACCAATCACTTC
<i>FRMD7</i> rev. (long range)	GTTAGCTTCCTGGGGAGGTC
<i>FRMD7</i> for. TaqMan	GGCTCTTCAGCTGGCTTCA
<i>FRMD7</i> rev TaqMan	CCAATTAGAGCAGAGGAAGGACAA

Supplementary Table 2. Overview of mutations introduced in *KATNA1*, *SLITRK1*, and *CALD1* in 33 single cell-derived colonies (SCCs) after multiplexed editing. Integration of targeted nucleotide substitutions (left blocking mutation, 'ancient' missense mutation, and right blocking mutation) and insertion/deletions (indels) is labelled with 'y', while absence of these mutations is labelled with 'n'. Homozygous (homo) or heterozygous (het) integration of the mutations is stated. Intended substitutions or indels are highlighted with green or gray, respectively. SCC 2 has an additional unintended substitution in *CALD1* and SCC 29 has an additional unintended substitution in *KATNA1*.

SSC	<i>KATNA1</i>					<i>SLITRK1</i>					<i>CALD1</i>								
	Haplotype A			Haplotype B		Haplotype A			Haplotype B		Haplotype A			Haplotype B					
	Left block	Ancient	Right block	Indel		Left block	Ancient	Right block	Indel		Left block	Ancient	Right block	Indel		Left block	Ancient	Right block	Indel
1	y (het)	y (homo)	y (homo)	n	n	y (homo)	y (homo)		n	y (het)	n	n	n	n	y (homo)	y (homo)	n	n	
2	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	y (homo)		n	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	
3	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
4	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
5	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
6	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
7	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	y (homo)		n	y (homo)	y (homo)	y (het)	n	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	
8	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
9	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
10	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
11	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
12	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
13	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
14	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
15	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	y (homo)		n	y (het)	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	
16	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
17	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
18	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	y (homo)		n	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	
19	y (homo)	y (het)	y (homo)	n	y (homo)	n	n	y (het)	n	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	
20	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
21	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	y (homo)		n	y (het)	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	
22	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	y (homo)		n	y (homo)	n	n	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	n
23	n	y (homo)	y (homo)	n	n	y (homo)	y (homo)		n	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	
24	n	y (homo)	y (homo)	n	n	y (homo)	y (homo)		n	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	
25	y (homo)	y (homo)	y (het)	n	y (homo)	y (homo)	n	n	n	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	
26	y (het)	y (homo)	y (homo)	y (het)	n	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n	y (het)	n	n	n	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	
27	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	y (homo)		n	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	
28	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
29	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	y (homo)		n	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	
30	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
31	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
32	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	y (homo)		n	y (homo)	y (het)	y (homo)	n	y (homo)	n	y (homo)	n	y (homo)	
33	y (het)	y (het)	y (het)	y (homo)	n	n	n	y (homo)	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	n

Supplementary Table 3. Overview of mutations introduced in *RB1CC1*, *PRDM10* and *TTLL5* in 21 single cell-derived colonies (SCCs) after multiplexed precise genome editing. Integration of targeted nucleotide substitutions ('ancient' missense mutation and left blocking mutation – dependent on the editing design of the respective gene) and insertion/deletions (indels) is labelled with 'y', while absence of these mutations is labelled with 'n'. Homozygous (homo) or heterozygous (het) integration of the mutations is stated. Intended substitutions or indels are highlighted with green or gray, respectively. SCC 15 has an additional unintended substitution in *RB1CC1* and *TTLL5*.

SSC	<i>RB1CC1</i>						<i>PRDM10</i>						<i>TTLL5</i>					
	Haplotype A			Haplotype B			Haplotype A			Haplotype B			Haplotype A			Haplotype B		
	Left block	Ancient	Indel		Left block	Ancient	Indel		Ancient	Indel		Ancient	Indel		Ancient	Indel		
1	y (het)	y (het)	n	n	n	n	n	y (homo)	n	n	y (het)	n	n	n	n	n	y (het)	
2	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	n	n	y (homo)	n	n	y (homo)	n	n	n	n	n	y (het)	
3	y (homo)	y (het)	n	y (homo)	n	n	y (homo)	n	n	y (homo)	n	y (homo)	n	y (homo)	n	y (homo)	n	
4	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	n	n	y (homo)	n	n	y (homo)	n	y (homo)	n	n	n	y (het)	
5	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
6	y (het)	y (het)	n	n	n	n	n	y (homo)	n	n	y (homo)	n	y (homo)	n	y (homo)	n	y (homo)	
7	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	y (het)	n	n	n	n	
8	n	n	n	n	n	n	n	y (het)	n	n	n	n	y (homo)	n	y (homo)	n	y (homo)	
9	y (het)	y (het)	n	n	n	n	n	y (het)	n	n	n	n	y (homo)	n	y (homo)	n	y (homo)	
10	n	n	n	n	n	n	n	y (het)	n	n	n	n	y (homo)	n	y (homo)	n	y (homo)	
11	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	n	n	y (homo)	n	n	y (homo)	n	y (homo)	n	y (homo)	n	y (homo)	
12	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	n	n	y (homo)	n	n	y (homo)	n	y (homo)	n	y (homo)	n	y (homo)	
13	y (het)	y (het)	n	n	n	n	y (het)	n	n	y (homo)	n	y (homo)	n	y (homo)	n	y (homo)	n	
14	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
15	y (het)	n	n	n	n	n	y (het)	n	n	y (homo)	n	y (homo)	n	y (homo)	n	y (homo)	n	
16	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	y (homo)	n	y (homo)	n	y (homo)	n	y (homo)	
17	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	n	n	y (homo)	n	n	y (homo)	n	y (homo)	n	y (homo)	n	y (homo)	
18	n	n	n	n	n	n	n	y (homo)	n	n	y (homo)	n	y (homo)	n	y (homo)	n	y (homo)	
19	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	n	n	y (homo)	n	n	y (homo)	n	y (homo)	n	y (homo)	n	y (homo)	
20	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	n	n	y (homo)	n	n	y (homo)	n	y (homo)	n	y (homo)	n	y (homo)	
21	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	

Supplementary Table 4. Overview of mutations introduced in *TTLL5*, *SV2C*, and *SLC8A1* in 29 single cell-derived colonies (SCCs) after multiplexed precise genome editing. Integration of targeted nucleotide substitutions ('ancient' missense mutation, left blocking mutation, and right blocking mutation – dependent on the editing design of the respective gene) and insertion/deletions (indels) is labelled with 'y', while absence of these mutations is labelled with 'n'. Homozygous (homo) or heterozygous (het) integration of the mutations is stated. Intended substitutions or indels are highlighted with green or gray, respectively. SCC 3 has an additional unintended substitution in *SLC8A1*.

SSC	<i>TTLL5</i>				<i>SV2C</i>						<i>SLC8A1</i>										
	Haplotype A		Haplotype B		Haplotype A			Haplotype B			Haplotype A		Haplotype B			Haplotype A			Haplotype B		
	Ancient	Indel	Ancient	Indel	Left block	Ancient	Indel	Left block	Ancient	Indel	Left block	Ancient	Right block	Indel	Left block	Ancient	Right block	Indel			
1	y (homo)	n	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	n	n	y (homo)	y (homo)	n	n			
2	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n			
3	n	y (het)	y (het)	n	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	y (homo)	y (het)	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n			
4	y (homo)	n	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	n	n	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n			
5	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n			
6	y (homo)	n	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n			
7	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n			
8	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n			
9	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n			
10	y (homo)	n	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n	n	n	y (homo)	n			
11	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n			
12	y (homo)	n	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	n	n			
13	n	n	y (het)	n	n	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	n	n	n	n	n	n	n	n	n			
14	y (homo)	n	y (homo)	n	n	y (homo)	y (homo)	y (homo)	y (homo)	y (homo)	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n			
15	y (homo)	n	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	y (homo)	y (het)	y (homo)	y (homo)	n	n			
16	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n			
17	y (homo)	n	y (homo)	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	y (het)	y (het)	n	n			
18	y (homo)	n	y (homo)	n	n	y (homo)	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n	n	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n		
19	y (homo)	n	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n	n	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n		
20	y (homo)	n	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n		
21	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n			
22	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n			
23	y (homo)	n	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	y (homo)	y (het)			
24	y (homo)	y (het)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	y (homo)	y (het)	y (homo)	y (homo)	n	n			
25	y (homo)	n	y (homo)	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n			
26	y (homo)	n	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	n	n	n	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n			
27	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n			
28	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n			
29	y (homo)	n	y (homo)	n	y (homo)	n	y (het)	y (homo)	y (het)	n	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n			

Supplementary Table 5. Overview of mutations introduced in *TTLL5*, *SV2C*, *SLC8A1*, and *PRDM10* in 33 single cell-derived colonies (SCCs) after multiplexed precise genome editing. Integration of targeted nucleotide substitutions ('ancient' missense mutation, left blocking mutation, and right blocking mutation – dependent on the editing design of the respective gene) and insertion/deletions (indels) is labelled with 'y', while absence of these mutations is labelled with 'n'. Homozygous (homo) or heterozygous (het) integration of the mutations is stated. Intended substitutions or indels are highlighted with green or gray, respectively.

SSC	<i>TTLL5</i>				<i>SV2C</i>				<i>SLC8A1</i>				<i>PRDM10</i>							
	Haplotype A		Haplotype B		Haplotype A		Haplotype B		Haplotype A		Haplotype B		Haplotype A		Haplotype B					
	Ancient	Indel	Ancient	Indel	Left block	Ancient	Indel	Left block	Ancient	Right block	Indel	Left block	Ancient	Indel	Left block	Ancient	Indel			
1	y (homo)	n	y (homo)	n	n	n	n	n	n	y (homo)	y (homo)	n	n	y (homo)	y (homo)	n	y (het)	n	n	n
2	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
3	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
4	y (homo)	n	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	n	n
5	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
6	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
7	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
8	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
9	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
10	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
11	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
12	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
13	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
14	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
15	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
16	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
17	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
18	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
19	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
20	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
21	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
22	y (homo)	n	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	n	y (homo)	y (homo)	n	n	n
23	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
24	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
25	n	y (het)	n	n	n	n	n	y (het)	y (het)	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
26	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
27	y (homo)	n	y (homo)	n	n	n	y (het)	y (het)	y (homo)	n	n	y (homo)	y (het)	y (het)	n	y (homo)	y (homo)	n	n	n
28	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
29	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
30	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
31	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
32	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
33	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n