

## Investigating Autism-linked Mitochondrial and Social Behavioural Deficits: MFN2 Knockdown in Zebrafish and Rescue by Human MFN2 Genes

Étude des déficits mitochondriaux et comportementaux sociaux liés à l'autisme : inactivation du gène MFN2 chez le poisson-zèbre et restauration par les gènes MFN2 humains

Raneem Salah<sup>1</sup>, Areej Mustafa<sup>1\*</sup>

1. Colonel By Secondary School, Ottawa, ON, Canada  
\*Corresponding author. Email: [areej.rihaab@gmail.com](mailto:areej.rihaab@gmail.com)

### Abstract | Résumé

Autism spectrum disorder (ASD) is a complex neurodevelopmental condition defined by impaired social interaction and repetitive behaviors (1). Emerging evidence suggests that mitochondrial dysfunction may be a contributor to ASD. Proper neuronal energy production is critical for synaptic function, which facilitates pro-social behavior. Mitofusin-2 (MFN2), a key regulator of mitochondrial fusion, shows reduced expression in ASD patients, and is associated with abnormal mitochondrial morphology that impairs ATP production. However, the direct causal link between MFN2-mediated mitochondrial dysfunction and autism-related social behavior remains unclear (2).

This study investigates the effects of MFN2 knockdown on neuronal energy and social behavior in zebrafish (*Danio rerio*), and whether human MFN2 expression can rescue these deficits. Zebrafish are widely used as a neurodevelopmental model because they possess conserved genetic pathways related to human neurological disorders and display quantifiable social behaviours such as shoaling. Additionally, their transparent embryos and rapid development allow efficient genetic manipulation and real-time observation of developmental effects. Zebrafish embryos will be divided into four groups: wild-type, sham-injected, MFN2 knockdown, and a knockdown group receiving human MFN2 mRNA for rescue. MFN2 knockdown will be achieved via antisense morpholino injection at the one-cell stage, with expression levels validated through quantitative polymerase chain reaction and Western blot. To assess the impact on cellular energy and sociality, neuronal ATP levels will be measured using a luminescent assay while social cohesion will be evaluated using shoaling behavioral assay with automated tracking software. The Average Inter-Individual Distance will be quantified as the primary metric of group cohesion.

It is hypothesized that MFN2 knockdown will impair mitochondrial fusion, leading to reduced neuronal ATP availability and disrupted pro-social behavior, while human MFN2 expression will restore both energy production and shoaling. By establishing MFN2 as a critical link between mitochondrial dynamics and sociality, this research will clarify the role of metabolic dysfunction in ASD, providing insights into potential molecular pathways for therapeutic intervention.

Le trouble du spectre de l'autisme (TSA) est une condition neurodéveloppementale complexe définie par l'interaction sociale affaiblie et des comportements répétitifs (1). Des données émergentes suggèrent qu'un dysfonctionnement mitochondrial pourrait contribuer aux TSA. Une production d'énergie neuronale adéquate est essentielle au bon fonctionnement des synapses, ce qui favorise les comportements prosociaux. La mitofusine-2 (MFN2), un régulateur clé de la fusion mitochondriale, présente une expression réduite chez les patients atteints de TSA et est associée à une morphologie mitochondriale anormale qui altère la production d'ATP. Cependant, le lien de causalité direct entre le dysfonctionnement mitochondrial induit par MFN2 et les comportements sociaux liés à l'autisme reste incertain (2).

Cette étude examine les effets de l'inactivation de la MFN2 sur l'énergie neuronale et le comportement social chez le poisson-zèbre (*Danio rerio*) et si l'expression de la MFN2 humaine peut remédier à ces déficits. Le poisson-zèbre est largement utilisé comme modèle de développement neurologique car il possède des voies génétiques conservées liées aux troubles neurologiques humains et présente des comportements sociaux quantifiables tels que le regroupement en bancs. De plus, la transparence de leurs embryons et leur développement rapide permettent une manipulation génétique efficace et l'observation en temps réel des effets sur le développement. Les embryons de poisson-zèbre seront divisés en quatre groupes : de type sauvage, ayant reçu une injection simulée, présentant une inactivation de la MFN2 et un groupe présentant une inactivation recevant de l'ARNm MFN2 humain. L'inhibition de la MFN2 sera réalisée par injection de morpholino antisens au stade unicellulaire, les niveaux d'expression étant validés par réaction en chaîne par polymérase quantitative et par un test Western Blot. Pour évaluer l'impact sur l'énergie cellulaire et la sociabilité, les niveaux d'ATP neuronal seront mesurés par un test de luminescence, tandis que la cohésion sociale sera évaluée par un test comportemental de regroupement avec un logiciel de suivi automatisé. La distance interindividuelle moyenne sera quantifiée comme principal indicateur de la cohésion du groupe.

L'hypothèse est que l'inhibition de la MFN2 altère la fusion mitochondriale, entraînant une diminution de la disponibilité d'ATP neuronal et une perturbation des comportements prosociaux, tandis que l'expression de la MFN2 humaine rétablit la production d'énergie et le regroupement en bancs. En établissant la MFN2 comme un lien essentiel entre la dynamique mitochondriale et la sociabilité, cette recherche permettra de mieux comprendre le rôle des dysfonctionnements métaboliques dans les TSA, et d'identifier des voies moléculaires potentielles pour des interventions thérapeutiques.

## References

1. American Psychiatric Association, What Is Autism Spectrum Disorder? Psychiatry.org (2024); <https://www.psychiatry.org/patients-families/autism/what-is-autism-spectrum-disorder>.
2. L. Citrigno, M. Muglia, A. Qualtieri, P. Spadafora, F. Cavalcanti, G. Pioggia, A. Cerasa, The Mitochondrial Dysfunction Hypothesis in Autism Spectrum Disorders: Current Status and Future Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*. 21, 5785 (2020). doi:10.3390/ijms21165785.